Supplemento ordinario alla “Gazzetta Ufficiale” n. 179 del 1° agosto 2002 - Serie generale

Spediz. abb. post. 45% - art. 2, comma 20/b
Legge 23-12-1996, n. 662 - Filiale di Roma

DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA Roma - Giovedì, 1° agosto 2002 SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI NON FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DELLA GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA 70 - 00100 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA G. VERDI 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 06 85081

AVVISO AGLI ABBONATI

A seguito dell'utilizzo di un nuovo sistema informatico di gestione degli abbonamenti, che a regime assicurerà un miglioramento qualitativo del servizio, si comunica che nei prossimi giorni potrebbero verificarsi dei disguidi nella consegna dei fascicoli della *Gazzetta Ufficiale*. Gli abbonati sono cortesemente pregati di voler segnalare prontamente a mezzo fax, al n. 06-85082520, eventuali inesattezze negli indirizzi di spedizione o il mancato recapito dei fascicoli. Si ringrazia anticipatamente per la cortese collaborazione.

N. 156

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI

DECRETO 8 luglio 2002.

Approvazione ed ufficializzazione dei Metodi di analisi microbiologica del suolo. (Decreto n. 010175).

SOMMARIO

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI

DECRETI, DELIBERE E ORDINANZE MINISTERIALI

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI

DECRETO 8 luglio 2002.

Approvazione ed ufficializzazione dei Metodi di analisi microbiologica del suolo. (Decreto n. 010175)**.**

IL MINISTRO DELLE POLITICHE
AGRICOLE E FORESTALI

Visti i decreti ministeriali 7 luglio 1990, n. 15517, 20 settembre 1990, n. 20611 e 3 gennaio 1996, n. 10001, con i quali è stato istituito e ricostituito il Comitato tecnico scientifico per l'Osservatorio nazionale pedologico e per la qualità del suolo, con funzioni di consulenza e proposizione all'Amministrazione centrale dell'agricoltura ed alle regioni e province autonome di iniziative in materia pedologica, tra l'altro in tema di standardizzazione di metodi di analisi del suolo;

Vista la legge 15 marzo 1997, n. 59, recante delega del Governo per il conferimento di funzioni e compiti alle regioni ed enti locali, per la riforma della pubblica amministrazione e per la semplificazione amministrativa;

Visto il decreto legislativo 4 giugno 1997, n. 143, recante conferimento alle regioni delle funzioni amministrative in materia di agricoltura e pesca e riorganizzazione dell'Amministrazione centrale;

Visto in particolare l'art. 2, comma 2, della legge predetta, laddove si stabilisce che il Ministero per le politiche agricole svolga, tra l'altro, compiti di disciplina generale e coordinamento nazionale in diverse materie, tra le quali la tutela della qualità dei prodotti agroalimentari, caratteristica dipendente in buona parte dalle condizioni di gestione del suolo e delle acque;

Visto il decreto legislativo 30 luglio 1999, n. 300, che riforma l'organizzazione del Governo e definisce le attribuzioni del Ministero delle politiche agricole e forestali;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 28 marzo 2000, n. 450, concernente il regolamento di organizzazione del Ministero delle politiche agricole e forestali;

Vista la Convenzione delle Nazioni unite per la lotta contro la desertificazione negoziata nel 1994 in seguito alle raccomandazioni della Conferenza delle Nazioni unite tenuta a Rio de Janeiro nel 1992, Convenzione che, ratificata dall'Italia con legge 4 giugno 1997, n. 170, riflettendo il capitolo 12 dell'Agenda 21 dedica una diffusa e particolare attenzione alle problematiche di conoscenza, difesa e salvaguardia del suolo e delle acque;

Vista la dichiarazione della Conferenza europea sullo sviluppo rurale tenuta a Cork nel 1996, ed in particolare il punto 4 – Sostenibilità, che afferma che le politiche degli Stati membri dell'Unione europea devono promuovere lo sviluppo rurale sostenendo la qualità e la bellezza dei paesaggi rurali europei, con riferimento particolare alle risorse naturali, alla biodiversità e all'identità culturale del territorio.

Visto il regolamento (CE) 1257/1999 del Consiglio sul sostegno comunitario allo sviluppo rurale sostenibile, che in particolare per le misure agroambientali è inteso a promuovere forme di conduzione dei terreni agricoli compatibili con la tutela e con il miglioramento delle diverse componenti ambientali;

Visto il decreto legislativo 11 maggio 1999, n. 152, recante disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole;

Visti i decreti ministeriali 11 maggio 1992, e 13 settembre 1999, con i quali sono stati approvati e resi ufficiali i Metodi di analisi chimica del suolo;

Visto il decreto ministeriale 1° agosto 1997 con il quale sono stati approvati e resi ufficiali i Metodi di analisi fisica del suolo;

Visto il decreto ministeriale 23 marzo 2000 con il quale sono stati approvati e resi ufficiali i Metodi di analisi delle acque per uso agricolo e zootecnico;

Considerato che per una valida politica nazionale di programmazione dell'uso del suolo e delle acque per uso irriguo va perseguita una approfondita conoscenza delle caratteristiche microbiologiche del suolo la quale è tuttora carente, e che a tal fine occorre, tra l'altro, meglio definire metodi standardizzati di analisi microbiologica del suolo, acquisendo anche vantaggiosamente nell'ambito nazionale metodi già definiti in ambito internazionale da istituzioni di normalizzazione come ISO e CEN;

Considerato che l'Istituto sperimentale per la nutrizione delle piante, organismo scientifico specialistico del Ministero per le politiche agricole, su incarico del Ministero e nell'ambito delle iniziative del Comitato tecnico scientifico per l'Osservatorio nazionale pedologico, attualmente in via di ricostituzione, ha definito gli accennati metodi di analisi microbiologica del suolo giovandosi di diverse collaborazioni esterne, ed in particolare delle Commissioni biologia del suolo e fertilità del suolo e nutrizione delle piante della Società italiana per la scienza del suolo;

Considerato che i metodi di analisi microbiologica del suolo in argomento costituiscono una necessaria continuazione della serie dei metodi di analisi del suolo già ufficializzati, diffusi e ampiamente usati dagli addetti ai lavori;

Ritenuto opportuno approvare e rendere ufficiali i metodi medesimi perché ne sia consentita la più diffusa utilizzazione nel territorio nazionale;

Decreta:

Art. 1.

1. Al fine di disporre di metodi di conoscenza standardizzati delle caratteristiche del suolo, utilizzabili per gli scopi di cui alle premesse, sono approvati e resi ufficiali i Metodi di analisi microbiologica del suolo di cui all'allegato al presente decreto, che ne costituisce parte integrante.

Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, 8 luglio 2002

Il Ministro: ALEMANNO

SOMMARIO

METODI DI ANALISI MICROBIOLOGICA DEL SUOLO

I – CAMPIONAMENTO

Metodo I.1

MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO, PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI DI SUOLO DA SOTTOPORRE AD ANALISI

1. Introduzione

Uno degli ostacoli principali alla divulgazione dei metodi di analisi microbiologiche e biochimiche del suolo riguarda le tecniche di campionamento, manipolazione e conservazione del campione da analizzare.

E' noto quanto i microrganismi del suolo rispondano tempestivamente a tutte le variazioni di temperatura ed umidità, pertanto i microbiologi, qualora non sia possibile realizzare l'analisi direttamente in campo, devono cercare di operare nelle condizioni più vicine a quelle in cui il suolo si trova prima di venire campionato.

Normalmente, per le analisi di tipo microbiologico viene consigliato di utilizzare un campione di suolo fresco e poco manipolato in cui la struttura e le proprietà metaboliche delle comunità microbiche presenti siano poco o affatto alterate. A tale fine il materiale da sottoporre ad analisi dovrebbe raggiungere il laboratorio in tempi brevi rispetto al momento del prelievo. Molto spesso questo non è realizzabile e, affinché i metodi di analisi sulle attività biochimiche e microbiologiche del suolo risultino di diffusa e generalizzata applicabilità, è importante poter disporre di metodi standard di prelievo, trattamento e conservazione dei campioni, che siano semplici e validi anche per la valutazione di altre tipologie di parametri. Si tratta di un approccio fondamentale per l'applicazione dei metodi microbiologici e biochimici nella definizione e nel controllo della qualità dei suoli, agrari o forestali che siano.

Precisando che per ciascun metodo riportato nel manuale verrà specificata la tipologia di trattamento del campione, vengono di seguito esposte alcune osservazioni di carattere generale sul campionamento e sulla conservazione del campione.

1.1. Metodologie e considerazioni statistiche

Una corretta procedura di campionamento deve assicurare che il campione che verrà poi analizzato sia quanto più possibile "rappresentativo" del sistema oggetto di studio. In presenza di una possibile disomogeneità è preferibile analizzare singolarmente i diversi prelievi, evitando i "campioni medi".

Per ottenere un campione medio, effettivamente rappresentativo di un appezzamento di suolo, la procedura più corretta prevede una scelta puramente casuale dei diversi punti di prelievo. Si utilizzano le tabelle dei numeri casuali (o randomizzati) facilmente reperibili, assieme alle modalità di utilizzo, sui testi di statistica (p. es., Lison, 1961), oppure i generatori di numeri casuali ormai disponibili anche su calcolatori tascabili. Ad esempio, l'appezzamento di suolo considerato, escludendo i bordi, può essere diviso su una pianta in scala in numerose zone di uguali dimensioni, che vanno numerate progressivamente. La Tabella dei numeri casuali verrà utilizzata per stabilire quali di queste sub-parcelle andranno campionate, asportando da ognuna una quantità uguale di suolo per formare il campione medio. La validità di tale procedura si basa sul fatto che ogni zona, dell'intero appezzamento, ha le identiche probabilità di contribuire a rappresentare il tutto.

Un'alternativa più semplice è quella di utilizzare una distribuzione regolare dei punti di prelievo. Ad esempio su un appezzamento rettangolare possono essere tracciate le diagonali e quattro punti di prelievo individuati a metà di ogni semi-diagonale. È da notare che, contrariamente a quanto possa sembrare, una distribuzione casuale normalmente non coincide con una regolare, pur potendo quest'ultima essere considerata sufficientemente valida dal nostro punto di vista, specie nel caso di

una zona omogenea. Per quanto riguarda la dimensione verticale, cioè la profondità di prelievo, ci si deve riferire al profilo del suolo, se ancora distinguibile, oppure alla coltura e/o la modalità di aratura adottata, le quali interessano a seconda dei casi una particolare profondità.
Per il dettaglio delle procedure di campionamento e della relativa strumentazione si rimanda al Cap. 1 del Manuale di Fisica del Suolo di questa stessa collana (Castrignanò, 1997).

1.2. Precauzioni da adottare per analisi microbiologiche e biochimiche
Varie specie di microrganismi sono presenti nel suolo non come cellule isolate omogeneamente disperse, ma in microcolonie costituite anche da centinaia di individui, distribuite disomogeneamente e associate in prevalenza alle particelle di materiale organico del suolo (Florenzano, 1983). Ai fini di un campionamento per analisi di attività della biomassa microbica del suolo è importante tenere presente gli effetti di questa eterogeneità di distribuzione dei microrganismi nel suolo, a livello non solo microscopico. Questa disomogeneità, verificabile anche in scala ben superiore al micron o alle decine di micron, può ripercuotersi in sensibili differenze qualora si sottopongano ad analisi quantità troppo esigue di suolo. Per fornire un criterio di riferimento, è bene non effettuare mai una singola analisi su una quantità di suolo inferiore al grammo. In ogni caso si consiglia di prelevare in campo campioni di suolo di almeno un ettogrammo, per ottenerne uno medio di almeno un chilo (salvo una riduzione di tali valori nel caso si disponga di ridotte quantità di suolo). Ogni singola analisi dovrebbe poi riguardare qualche grammo di suolo.
Un'ulteriore fonte di disomogeneità è "l'effetto rizosfera". La microflora è più abbondante, anche di più ordini di grandezza, e più attiva nelle immediate vicinanze (millimetri) delle radici, ciò a causa dell'effetto stimolante dei composti organici, essudati in diversa misura dalle radici stesse (Florenzano, 1983). È opportuno evidenziare che a livello microbiologico può essere interessante studiare sia la distribuzione microbica nel suolo rizosferico (suolo adeso intorno all'apparato radicale) che quella nel suolo non rizosferico indicato di solito in letteratura come "bulk soil". Nel secondo caso, per evitare sovrastime dell'attività microbica per l'effetto rizosfera, si cercherà di campionare il suolo a debita distanza dalla vegetazione.
I campioni da sottoporre ad analisi microbiologiche devono essere prelevati e mantenuti in condizioni tali da evitare eccessive contaminazioni con microrganismi estranei, compresi quelli presenti nell'aria, oltre che con sostanze chimiche potenzialmente dannose. Questo si ottiene usando strumenti e contenitori perfettamente puliti anche se non sterilizzati ed evitando il prolungato contatto diretto con l'aria dell'ambiente. L'elevata carica microbica normalmente presente nel suolo può giustificare una ridotta applicazione delle precauzioni. Una limitata contaminazione non ha, infatti, complessivamente effetti rilevabili su determinazioni quantitative riguardanti gruppi microbici molto diffusi nel suolo quali quelli oggetto della presente opera. È quindi sufficiente lavare accuratamente tutto ciò che nelle varie fasi viene a contatto con il campione di suolo, sciacquare con acqua potabile di rete e non asciugare con materiali che potrebbero apportare contaminazione. È assolutamente da evitare l'impiego di sostanze disinfettanti persistenti come p. es. i sali d'ammonio quaternario.
Qualora siano oggetto di indagine gruppi anaerobi, non sono necessarie particolari precauzioni, tranne che in casi particolari come nello studio dei Metanobatteri, che comprendono forme con spiccata intolleranza all'ossigeno molecolare, per i quali si rimanda al capitolo specifico per l'intera procedura d'analisi.

2. Epoca di campionamento
Per quanto riguarda il periodo in cui effettuare il prelievo, si deve tenere presente che la microflora subisce delle oscillazioni quali-quantitative legate alle condizioni ambientali, alla temperatura, alle precipitazioni, ecc. Converrà quindi riferirsi, ad esempio, ad una situazione media o comunque non estrema. Si eviterà di campionare dopo un periodo di particolare siccità o piovosità. Qualora si voglia determinare il parametro microbiologico e biochimico in condizioni normali ci si dovrà altresì cautelare riguardo a possibili ripercussioni sulla microflora e sulla sua attività da parte di alcuni tipici

trattamenti del suolo (fumigazioni, applicazioni di fertilizzanti organici o inorganici e di fitofarmaci, ecc.) per almeno un periodo di 30 giorni.
Un'altra importante conseguenza delle oscillazioni della microflora prima menzionate è che, se si eseguono confronti fra trattamenti del suolo, i relativi campionamenti non possono essere effettuati in tempi diversi. È opportuno infatti in questo caso prendere in considerazione, su un appezzamento sufficientemente omogeneo, sia parcelle non trattate (controllo) sia trattate ove procedere a campagne di prelievo sincrone.
Per quanto riguarda le analisi biochimiche, è anche possibile lavorare su suolo essiccato all'aria e successivamente condizionato in laboratorio. In questo caso l'epoca di prelevamento è relativa esclusivamente alla maggiore praticità delle operazioni, è infatti sufficiente evitare i periodi in cui i suoli da campionare sono intrisi di acqua o quando sono troppo asciutti. In genere si procede con un successivo riumettamento a condizioni standard che permette il confronto biochimico di suoli campionati in periodi diversi dell'anno o addirittura in anni diversi (confronta §1.7. e 1.8. di questo capitolo).

3. Profondità del prelievo
Solitamente è consigliato che il prelievo di suolo destinato ad analisi microbiologiche e biochimiche sia eseguito alla profondità di 0-15 cm poiché, di norma, è questo lo strato di suolo maggiormente colonizzato dai microrganismi. Si tratta comunque di un approccio non sempre valido dal momento che la distribuzione della biomassa microbica lungo il profilo di un suolo è regolata da molteplici fattori e differisce anche in base al tipo di gestione da parte dell'uomo. A parità di tipo di suolo, infatti, un prato naturale polifita ed un campo arato devono essere campionati in modo differente; nel primo si avrà in linea di massima una biomassa localizzata nei primi 5 cm di profondità, nel secondo sarà necessario campionare anche gli strati più profondi. Avviene infatti che nei suoli agrari i microrganismi risultino distribuiti piuttosto uniformemente lungo tutto il fronte dell'aratura (es. 0-40 cm). Inoltre, una coltura con apparati radicali molto sviluppati (es. *Zea mais*) influirà ulteriormente sulla distribuzione della microfauna e della microflora del terreno, la quale si spingerà a profondità maggiori in funzione della presenza di sostanza organica e di essudati radicali. In queste situazioni sarà pertanto necessario, come già accennato, effettuare un campionamento mirato che permetta di condurre le analisi sia dello strato di suolo interessato dall'aratura (0-30/0-40 cm) che dello strato in cui si spingono gli apparati radicali (circa 30-60 cm).
In alcuni studi è invece necessario seguire uno schema di campionamento differente. Primo fra tutti è il caso in cui vengono effettuate le analisi del suolo secondo la classificazione pedologica in cui si richiede un'accuratezza assai maggiore di quella finora esposta. Per un profilo di un suolo con copertura forestale può essere necessario il prelievo di un elevato numero di campioni, pari al tipo di stratificazione incontrata e quindi alla particolare struttura pedologica del suolo stesso. Appare pertanto chiaro come la metodica di campionamento da seguire debba riflettere le finalità dell'indagine e, allo stesso tempo, rispettare le caratteristiche del suolo in esame.
Lo studio dell'attività di alcuni gruppi particolari di organismi del suolo, infine, può comportare l'utilizzo di procedure di campionamento assai particolari. È il caso ad esempio dei microrganismi anaerobi che non necessitano di ossigeno né di luce e che pertanto possono colonizzare in alcuni suoli anche gli strati profondi, proibitivi per altre forme di vita microbica.

In sintesi dunque è bene seguire le seguenti regole generali:
a) nei suoli arativi soggetti a rovesciamento o rimescolamento, prelevare il campione alla massima profondità di lavorazione del suolo ed eventualmente, distinguendo i due campioni, anche lo strato immediatamente sottostante al limite di lavorazione.
b) nei suoli a prato naturale e a pascolo è necessario eliminare attentamente la cotica erbosa, per poi campionare lo strato interessato dagli apparati radicali delle specie erbacee. In generale, per le analisi biochimiche è comunque sufficiente campionare a profondità di 0-10 o 0-20 cm.

c) nei suoli forestali prelevare più strati seguendo il profilo pedologico ed avendo particolare cura nel campionamento degli orizzonti organici ed eventualmente della lettiera, sia fresca che parzialmente decomposta. In genere, anche nel caso dei suoli forestali, essendo la biomassa microbica localizzata nei primi 0-10/0-20 cm di suolo, non è necessario spingersi con il campionamento molto oltre questa profondità, salvo particolari esigenze di studio.

4. Scheda di campagna

È buona norma, soprattutto se ad effettuare i campionamenti non è lo stesso analista, avere cura di allegare al campione una breve scheda di campagna che riassuma le osservazioni di campo ed i dati essenziali relativi allo stesso prelievo di suolo. I campioni, accompagnati ciascuno dalla propria scheda, potranno così raggiungere il laboratorio di analisi ed essere "giudicati" anche sulla base di quel bagaglio di informazioni che senza la scheda andrebbe perso. L'interpretazione di molti dati analitici, specie se di tipo microbiologico, non può infatti prescindere talvolta dalla conoscenza delle caratteristiche del sito di campionamento (nel caso dei suoli forestali il tipo di copertura vegetale, la sua età, l'esposizione, la vicinanza di centri abitati, ecc.).
Di seguito viene fornito un modello-base di scheda di campagna che potrà costituire lo schema su cui costruire delle schede finalizzate a specifici interessi.
La scheda di campagna potrà comprendere anche degli schemi o dei disegni raffiguranti l'ubicazione nell'area d'esame dei siti di campionamento. Ciò risulta particolarmente utile nel caso in cui il campionamento preveda la miscelazione in laboratorio di suolo prelevato da più punti per la formazione di un campione medio. In mancanza di un sistema di georeferenziazione una mappa con un sufficiente numero di punti di riferimento (punti cardinali, edifici, alberi isolati, tralicci ecc.), permette infatti di ripetere nel tempo lo stesso tipo di campionamento o di verificare, per un'area definita, le fluttuazioni del dato sperimentale per cause pedologiche o microclimatiche.
Particolare cura dovrà inoltre essere riposta nel confezionamento in campo del campione: una busta in plastica capiente e resistente dovrà recare in modo univoco il nome del campione, sia scritto direttamente su di essa con un pennarello indelebile (non idrosolubile e adatto ad ogni superficie) che segnato su un cartellino inserito in una bustina trasparente di plastica ed aggiunto al suolo al suo interno. Un altro cartellino sarà fissato saldamente all'esterno della busta. La busta dovrà chiaramente risultare ben chiusa (sono in commercio degli appositi sistemi di chiusura dentati, ma anche dei semplici fili di metallo ricoperti da plastica).
In assenza di una scheda pre-stampata del tipo di quella riportata successivamente sarà cura di chi effettuerà il prelevamento di campioni di appuntare in modo chiaro per ogni sito almeno le seguenti osservazioni: numero del campione, località (eventualmente posizionamento su carta georeferenziata), data, nome dell'operatore, copertura vegetale, uso del suolo, pendenza, vicinanza di centri abitati od insediamenti industriali, trattamenti subiti (se suolo agrario o rimboschito), esposizione, profondità del prelievo ed una descrizione di massima del suolo (consistenza, colore, presenza e dimensioni di apparati radicali, ecc.).

SCHEDA DI CAMPAGNA

1) Dati generali		**Campione N°**	
Oggetto:		**Data del rilievo**	
Rilevatore		**Coordinate chilometriche della stazione**	
Località		**Regione/Provincia/Comune**	
2) Descrizione della stazione			
Esposizione			
Pendenza %		Quota m.s.l.m.	
Rocciosità			
a) qualità			
b) quantità %			
Pietrosità			
a) qualità			
b) quantità %			
3) Descrizione del suolo			
Profondità del prelievo in cm:			
Radici:	dimensioni:		
	quantità:		
4) Precipitazioni			
Piovose:	**Nevose:**	**Medie mensili:**	
Temperature dell'aria (medie mensili):			
Esposizione:			
Venti dominanti:			
Vicinanza di centri urbani, industriali, autostrade, ecc.:			
Tipo di vegetazione e approssimativamente % di copertura:			
Prato	**Alto fusto (specificare l'essenza)**	**Colture**	**Altro**
Uso del suolo (agricolo, pascolamento, fruizione turistica, ceduo, riserva naturale etc.)			
Descrizione della superficie del terreno al momento del prelievo del campione (colore, presenza di croste superficiali, affioramento di materiali particolari come metalli, plastiche, frammenti di cemento e laterizi)			
ALTRE NOTE:			

5. Preparazione del campione

5.1. Premessa

Anche per questa fase, modifiche particolari alla procedura possono essere previste nei capitoli specifici.

Per motivi legati alla praticità, rappresentatività del campione e possibilità di effettuare più analisi, o di replicarle in caso di dubbi, è consigliabile prelevare un campione totale di almeno un chilogrammo. La singola analisi viene poi condotta su di una quantità minore, per cui si ripresenta in questo sub-campionamento il problema della rappresentatività. In questa fase si può ricorrere ad un preliminare accurato rimescolamento dell'intero campione, cui si accoppia la frantumazione delle zolle e la setacciatura con maglie da 2 mm che allontana i residui vegetali e lo scheletro. E' evidente che tali operazioni vanno effettuate sull'intera massa del campione, prima dei prelievi per le analisi.

Quando si deve operare su un campione fresco le condizioni di umidità del suolo possono rendere difficoltosa e lenta la setacciatura: si deve comunque evitare un'eccessiva asciugatura (evitare ad esempio di lasciare a lungo in uno strato sottile il suolo setacciato). Può risultare utile far precedere la setacciatura a 2 mm da una a 5 mm.

Le precauzioni riguardanti contaminazioni di cui si è già discusso possono essere sufficientemente rispettate anche in questa fase utilizzando strumenti accuratamente puliti. Può risultare più comodo e veloce utilizzare direttamente le mani per la setacciatura, impiegando in tal caso guanti in gomma sterili o almeno preventivamente lavati.

5.2. Oggetto e campo di applicazione

Il presente metodo si applica a tutte le tipologie di suolo per la determinazione di parametri microbiologici e biochimici atti a rilevare le attività metaboliche della biomassa microbica in condizioni sperimentali standard (non di campo).

5.3. Principio

Il metodo si basa sulla scelta di procedure atte all'ottenimento di uno o più campioni da utilizzare in laboratorio, rappresentativi del livello medio e/o della variabilità del suolo da sottoporre ad analisi in condizioni standard.

5.4. Materiali ed apparecchiatura

In generale, per il prelievo viene utilizzata la medesima attrezzatura consigliata nel manuale dei metodi per la Chimica del Suolo (cfr. Violante P., coordinatore, Manuale Metodi Ufficiali per la Chimica del Suolo). A seconda poi che si scelga di condurre le analisi su campioni freschi o seccati all'aria sono necessarie delle precisazioni ulteriori.

6. Uso del campione di terreno fresco

6.1. Premessa

Come già ricordato nell'introduzione del capitolo, il suolo è un habitat estremamente eterogeneo in cui fasi diverse (minerale, organica, gassosa, liquida) interagiscono a formare microambienti che differiscono enormemente fra loro, pur distando pochi millimetri. Se a questo si aggiunge la rapidità con cui i parametri micro-ambientali possono variare appare chiaro come le popolazioni microbiche nel suolo costituiscano delle comunità necessariamente plastiche, in grado cioè di fluttuare in funzione dell'ambiente. La formazione di spore resistenti o l'attuazione di strategie mirate a sfruttare situazioni puntuali offerte dallo specifico microambiente (es. strategie r/K, competizioni, simbiosi, capacità di attivare vie metaboliche alternative, etc.) fanno delle comunità microbiche del suolo un sistema in continua evoluzione. Analizzare aspetti funzionali "reali" delle comunità microbiche del suolo, ovvero attività specifiche relative a momenti particolari della loro vita nel tempo o nello spazio, talvolta è

utopico. Persino alcune delle misure di campo non rispecchiano la realtà (es. respirazione del terreno in campo) dal momento che "misurare" significa comunque alterare un equilibrio e quindi imporre un cambiamento. Premesso ciò, ritenere un campione di terreno "fresco" capace di riflettere a livello microbico le condizioni di campo non è realistico. Ciononostante per alcuni studi è necessario lavorare con campioni che non abbiano subito "traumi" eccessivi dal punto di vista della temperatura (congelamento) e dell'umidità (essiccazione). Sia il congelamento che l'essiccazione, infatti, inducono molti gruppi microbici a formare strutture di resistenza o permettono a specie più resistenti di prevalere, comportando pertanto un sensibile mutamento nella composizione della comunità. Chiaramente questi mutamenti possono avvenire anche naturalmente in un suolo che risulti, per motivi climatici stagionali, periodicamente congelato o seccato. L'uso di campioni di suolo freschi, avendo come prerogativa quella di rispecchiare il più possibile le condizioni di campo, richiedono più che mai accortezze che prevengano fluttuazioni di temperatura ed umidità. Sebbene non esista sufficiente letteratura sul confronto del comportamento di campioni di suolo di regioni climatiche diverse del Pianeta di fronte a fluttuazioni di temperatura e di umidità, è plausibile ritenere che, a livello di comunità microbica, per un terreno di climi caldo-aridi abbia un effetto maggiore un repentino raffreddamento che non una perdita di umidità. Vice-versa per un campione di suolo da un'area sottoposta naturalmente a gelate un riscaldamento può essere fatale.

6.2. Oggetto e campo di applicazione

Tale procedura è applicabile a tutti i tipi di suolo. L'uso di campioni di suolo fresco è consigliato in tutti quegli esperimenti in cui si vogliano determinare le attività della biomassa microbica nelle condizioni "di campo", ovvero il più possibile vicine a quelle riscontrabili all'atto del campionamento. Talvolta è necessario, prima di sottoporre il campione ad analisi, procedere comunque ad una fase di pre-incubazione per evitare che la misura dell'attività venga influenzata dal "disturbo" delle stesse operazioni di raccolta del campione.

6.3. Principio

Il metodo si basa sulla manipolazione e conservazione del campione nelle condizioni più vicine a quelle di campo.

6.4. Procedura consigliata

6.4.1. Materiali ed apparecchiatura

- Vasi di vetro o sacchetti sterili.
- Lacci di plastica per sigillare.
- Contenitore da trasporto refrigerato.
- Setacci a 5 e a 2 mm.

6.4.2. Procedimento

Introdurre il suolo campionato in vasi di vetro o sacchetti di plastica puliti o sterilizzati, sigillati accuratamente e completamente pieni per mantenere nel suolo le condizioni di umidità originarie. Tutti i recipienti ed i materiali che dovranno venire a contatto con il campione dovranno essere inerti, non dovranno cioè interagire chimicamente con alcuna delle componenti del campione stesso (in alcuni casi l'alluminio, ad esempio, è sconsigliato).

Se non è possibile portare in laboratorio a breve termine i campioni, trasportarli in contenitore refrigerato ma senza rischi di congelamento (vengono in genere utilizzati i frigoriferi portatili da picnic.). Setacciare a 2 mm (eventualmente prima a 5 mm) e rimescolare accuratamente l'intera massa di ogni campione da sottoporre ad analisi, con le consuete cautele riguardo alle contaminazioni e limitando l'asciugatura del materiale. Radici e frazioni grossolane dello scheletro possono essere rimosse manualmente avendo cura di non inquinare il campione. Conservare poi i campioni al buio a circa +4°C. Prevedere tutte le analisi entro il più breve tempo possibile.

6.4.3. Osservazioni
Se lo scopo delle analisi è di indagare su differenze fra suoli (p. es. dovute a qualche trattamento) è opportuno curare la standardizzazione di tutta la procedura, dal campionamento all'analisi, per evitare che possibili alterazioni in queste fasi agiscano differentemente sui vari campioni, così da simulare una differenza non realmente esistente in campo: p. es. conservare i campioni nello stesso luogo, randomizzare la successione delle analisi, ecc.

7. Essiccazione all'aria del campione

7.1. Premessa
Per facilitare il compito di un analista, il requisito migliore che può avere un campione di suolo da analizzare, è quello di poter essere utilizzato per la determinazione del maggior numero possibile di parametri. A tal fine possono essere seguite le tecniche di campionamento e trattamento, standardizzate per i Metodi Chimici del suolo, con l'accortezza di essiccare il campione all'aria (non in stufa o in flusso d'aria) nel minor tempo possibile dalla raccolta, in ambiente buio ed aerato e comunque protetto da possibili fonti inquinanti (chimiche, fisiche o biologiche).
Trovandosi lontani dal proprio laboratorio sarà sufficiente utilizzare sacchetti di plastica più grandi del necessario, in modo da poter allargare sul fondo il campione di suolo (da evitare chiaramente sia la chiusura ermetica dei contenitori che la pratica, assai nociva, di lasciare il materiale campionato sotto al sole o in una vettura arroventata). Tale tecnica presenta l'indiscutibile vantaggio di poter omogeneizzare più efficacemente il campione, vagliandolo successivamente a 2 mm. Inoltre un subcampione, seccato e vagliato, potrà essere conservato in un barattolo di vetro scuro o di plastica opaca sigillato ermeticamente, anche per lunghi periodi. In questo modo sarà possibile ripetere con successo le analisi e contare sulla possibilità di effettuare verifiche successive.
Su tale campione andrà successivamente determinata sia l'umidità residua che la capacità di ritenzione capillare, al fine di poter riferire il dato analitico a 100 g di terreno secco a +105°C (cfr. Manuale Metodi Chimici n.c.n.) e di poter, in seguito, incubare il suolo in condizioni di umidità potenziali (cfr. in questo capitolo il paragrafo successivo sulla procedura di condizionamento).

7.2. Oggetto e campo di applicazione
Il presente metodo è applicabile a qualsiasi tipo di suolo in cui si vogliano misurare le attività microbiologiche in condizioni non di campo. Se ne consiglia l'uso qualora si abbia l'esigenza di ottenere informazioni sull'attività del suolo in condizioni standard per rilievi:
- puntiformi (in cui cioè è necessario avere una misura di potenzialità);
- confrontabili nel tempo;
- ininfluenti rispetto alle fluttuazioni dei parametri climatici, stagionali, etc.

Se ne sconsiglia l'uso qualora siano richieste informazioni sulle attività in condizioni di campo e sull'attività reale della biomassa microbica.

7.3. Principio
Il metodo si basa sull'essiccazione all'aria di campioni di suolo secondo la procedura di seguito consigliata, finalizzata alla conservazione nel campione dell'attività microbiologica potenziale del suolo da cui proviene.

7.4. Procedura consigliata

7.4.1. Materiali ed apparecchiature
- vaschette capienti in materiale inerte (vetro o plastica);
- macinino a palle;

- mortaio e pestello in ceramica;
- un setaccio a 2 mm;
- un ripiano in un luogo fresco, buio ed aerato;
- contenitori puliti, inerti ed ermetici dove conservare il terreno essiccato;
- etichette;
- pennarello indelebile per tutte le superfici.

7.4.2. Procedimento

Disporre il terreno campionato nelle bacinelle di materiale inerte, allargandolo in modo che sia distribuito su uno spessore di pochi centimetri (1-2). Sistemare le bacinelle su un ripiano, in un luogo fresco, buio ed aerato e lasciarlo essiccare, eventualmente rimescolandolo delicatamente ad intervalli di tempo per accelerare il processo.

Una volta essiccato il terreno dovrà essere vagliato a 2 mm, avendo cura di rimuovere manualmente lo scheletro e le radici. Nel caso di terreni con un'alta percentuale di argilla prima della setacciatura può essere necessario intervenire con una macinatura a mano (con pestello) o con un macinino meccanico o elettrico. In quest'ultima eventualità si dovrà avere cura di pulire accuratamente lo strumento fra un campione e l'altro per evitare contaminazioni.

Il terreno sarà quindi conservato chiuso in recipienti puliti, di materiale inerte, accompagnati da etichette per l'identificazione ed eventualmente dalla relativa scheda di campagna. I contenitori, a loro volta, dovranno essere mantenuti in un ambiente buio, asciutto e fresco.

7.4.3. Osservazioni

Riguardo al problema della rispondenza con la realtà di campo dei valori di attività della biomassa microbica ottenuti con campioni trattati secondo questo metodo, va specificato che le discussioni in ambito accademico sono varie e diversificate. In generale viene sottolineato come il tipo di stoccaggio e di condizionamento dei campioni di suolo siano determinanti ai fini della misura, dal momento che le comunità di microrganismi che si "risvegliano" non potranno mai corrispondere alle comunità reali. Si è visto comunque che nel caso di suoli di ambienti mediterranei, xerici o naturalmente soggetti a periodi di siccità e ad elevate temperature (in cui cioè i microrganismi sono adattati agli stress idrici), un blando essiccamento all'aria con un successivo oculato condizionamento a T °C ed U% definite, permette di stimare con successo le dimensioni delle comunità microbiche.

8. Condizionamento mediante preincubazione dei campioni

8.1. Premessa

Tutte le volte che un campione di suolo deve essere analizzato fresco, e questo non è realizzabile, è possibile ovviare al problema preincubando il suolo (conservato essiccato o congelato) alle condizioni richieste dalla procedura analitica specifica. Il procedimento di preincubazione dei campioni viene riportato di seguito nella apposita scheda.

Nei casi in cui la procedura analitica richieda l'addizione di un substrato (come la caseina lattica, l'arginina, il glucosio, ecc.), l'aggiunta dovrà essere effettuata dopo circa 10 giorni di preincubazione (il tempo di preincubazione varia da suolo a suolo e dipende da molteplici fattori). Il suolo dovrà pertanto essere incubato in bacinelle di vetro o di materiale inerte ricoperte da un film di plastica forato; sempre seguendo la procedura del controllo periodico dell'umidità, riumettandolo ogni volta in base alla pesata. Nel caso del condizionamento con aggiunta di substrato va sottolineata la necessità di condurre in parallelo il condizionamento di un "bianco" che serva da controllo per il campione addizionato. È indispensabile cioè disporre di un sub-campione in cui non sia stata effettuata l'aggiunta e che permetta pertanto di valutare, per differenza, il disturbo arrecato alla componente microbica dalla sostanza utilizzata. Il "bianco" dovrà subire tutti i passaggi riservati ai subcampioni addizionati di substrato (mescolamento, eventuale trasferimento in altri recipienti, ecc.) tranne, chiaramente,

l'aggiunta del substrato. Poiché, inoltre, durante la manipolazione del suolo condizionato (preparazione dei subcampioni ecc.) viene comunque alterato l'equilibrio raggiunto dal suolo durante la preincubazione, in alcune prove in cui si voglia misurare anche l'effetto di disturbo della manipolazione effettuata in laboratorio sul campione preincubato, può essere necessario un secondo bianco che non verrà mescolato né cambiato di recipiente. Si procederà, sin dall'inizio della prova, alla preparazione di un sottocampione che sarà incubato alle stesse condizioni ma che non sarà manipolato fino al momento dell'analisi.

8.2. Oggetto e campo di applicazione
La preincubazione si applica a tutti i campioni di terreno di cui si vogliano misurare attività microbiologiche e biochimiche. Si tratta di un procedimento necessario qualora i campioni siano stati conservati seccati all'aria, liofilizzati, refrigerati o congelati. È consigliabile comunque preincubare il terreno anche prima di procedere ad analisi su campioni di suolo fresco al fine di minimizzare, nel campione, l'effetto "disturbo" dovuto alla fase di prelievo e di setacciatura del campione.

8.3. Principio
Il metodo si basa sull'incubazione del campione da analizzare a temperatura ed umidità ben definite, per un tempo sufficiente da indurre nella comunità microbica un adattamento alle condizioni imposte sperimentalmente. Tali condizioni potranno essere "potenziali", ovvero tarate per ottenere il massimo valore della risposta attesa (ciò cambierà da suolo a suolo in base alle caratteristiche specifiche come la ritenzione capillare, etc.) oppure studiate per ottenere una risposta in funzione di fluttuazioni sperimentali di uno specifico parametro (p. es. temperatura, grado di saturazione, etc.).

8.4. Procedura consigliata

8.4.1. Materiali ed apparecchiature
- fogli in plastica pesante o bacinelle basse ed ampie sempre in plastica;
- spruzzatore per acqua;
- stufa termostatata;
- recipienti per incubazione del suolo (specifici per ogni metodo: vials, beackers, etc.);
- parafilm;
- pipette pasteur;
- bilancia tecnica;
- pennarello per tutte le superfici e resistente all'acqua.

8.4.2. Procedimento
I campioni di suolo essiccati vengono:
- distesi su un foglio di plastica per uno spessore di 1 cm, quindi mediante uno spruzzatore umettati con tanta acqua quanta ne richiede per essere portato alla % della capacità di ritenzione capillare come da metodologia specifica (Klute, 1986);
- coperti con un altro foglio di plastica e lasciati riposare per 2-3 h;
- sottoposti alle pesate necessarie alle successive procedure analitiche.

I recipienti contenenti le aliquote di suolo da analizzare (matracci, beakers, buckners, vials, ecc.), di cui è fondamentale segnare il peso complessivo (recipiente + suolo + acqua), sono incubati alla temperatura desiderata (in genere specificata dal metodo) per 10 giorni, coperti da un film di plastica opportunamente forato (devono poter avvenire gli scambi gassosi, ma si deve nel contempo limitare la velocità di evaporazione dell'acqua).
Ogni due giorni è necessario controllare l'umidità pesando i singoli recipienti, dopo aver rimosso il film di plastica, ed aggiungendo con lo spruzzatore o con una pipetta Pasteur la quantità d'acqua

idonea a ripristinare il peso segnato all'inizio dell'incubazione. Si deve avere cura di ricoprire ogni volta i recipienti con il film di plastica forato.
L'esubero di campione umettato potrà essere conservato in frigorifero, a circa +4°C per 1 mese, quindi riutilizzato. Se necessario si potrà ripetere su di esso l'intera procedura di condizionamento (pesata, preincubazione, ecc.).

8.4.3. Osservazioni

Il condizionamento del suolo può essere effettuato a differenti umidità e temperature, secondo lo scopo della ricerca. In generale si suggerisce di portare il suolo al 100% della capacità di ritenzione idrica capillare (ovvero di aggiungere tanta acqua quanta ne viene trattenuta dal suolo sottoposto ad una pressione di –33 KPa) e di condizionarlo alla temperatura richiesta dall'esperimento (ed. +30°C è la temperatura valida per i suoli tipici dell'ambiente mediterraneo). Per realizzare ciò è necessario conoscere l'umidità (U%) del suolo seccato all'aria (l'essiccazione all'aria fa sì che il terreno trattenga comunque dell'acqua) e il valore della sua ritenzione idrica capillare (RC). Quest'ultima consiste nel volume percentuale di acqua trattenuta dal suolo sottoposto ad una pressione di –33 KPa con il metodo della piastra di Richards (Metodi di analisi di fisica del suolo, 1997). La quantità di acqua da aggiungere (H_2O) si calcola con la seguente espressione:

$$H_2O=RC\%-(X-100)$$

dove:

$$X=10.000/CU\%$$

con X= quantità di terreno secco all'aria che deve essere pesato per avere 100 grammi di suolo secco a +105°C;
e dove:

$$CU\%=100-U\%$$

ovvero il "complemento a 100" dell'umidità del suolo essiccato all'aria.
Inoltre per esprimere i risultati delle analisi effettuate su suoli condizionati al 100% della capacità di ritenzione capillare in valori riferiti al secco a +105°C, come di norma, è necessario moltiplicarli per un fattore ($F_{105°}$) ottenuto dalla seguente espressione:

$$F_{105°}=100/CU^*\%$$

dove CU*% è il complemento a 100 dell'umidità del campione condizionato. Quest'ultima si ottiene per gravimetria dopo aver essiccato un'aliquota del suolo condizionato a +105°C.

9. Conservazione dei campioni di terreno

9.1. Premessa

Fermo restando che la soluzione ideale, quando si debba lavorare su campione fresco, è l'analisi immediatamente successiva al prelievo (entro poche ore), è spesso inevitabile una più o meno lunga conservazione dei campioni di suolo. Si deve, in questo caso, tenere presente che l'oggetto delle indagini sono organismi viventi, i quali possono morire, o crescere, secondo le condizioni ambientali in cui vengono a trovarsi. Nel presente capitolo sono fornite prescrizioni di carattere generale; modifiche delle procedure dovute ad esigenze particolari sono esposte nei capitoli specifici.
La liofilizzazione, la surgelazione, il congelamento e l'essiccazione all'aria, comportano inevitabilmente la morte di numerose cellule microbiche (Jensen, 1962; Stotzky et al., 1962; West et al., 1986 e 1987). Ciononostante per molti suoli così conservati è possibile, attraverso un periodo di condizionamento a temperatura ed umidità controllate, ripristinare in laboratorio l'attività della

biomassa microbica. Nel caso di studi di confronto e di procedure analitiche che lo consentono, è possibile conservare il suolo congelato o essiccato in modo da affrontare le analisi in tempi anche molto diversi da quelli in cui è stato effettuato il campionamento (alcuni suoli mantengono la capacità di riattivarsi per molti anni). Riguardo al problema della rispondenza con la realtà di campo dei valori d'attività ottenuti su terreni condizionati, è chiaro che le misure su suoli "risvegliati" saranno potenziali, ovvero relative alle specifiche condizioni di temperatura e umidità adottate in laboratorio. Questo approccio è consigliato nel caso non si voglia tenere conto delle fluttuazioni stagionali della biomassa microbica; esso infatti permette di prescindere dalle condizioni di campo e nel contempo di confrontare, in condizioni standard predefinite ed uniformi, l'attività di campioni differenti (Benedetti et al., 1992; Rossi et al., 1992).
Come già accennato, nel caso specifico dei suoli di ambienti mediterranei, abitualmente sottoposti a periodi di siccità e ad elevata temperatura si è visto che un blando essiccamento all'aria permette di conservare campioni in ottimo stato anche per lunghi periodi. Ai fini delle analisi biochimiche e di attività microbica su suoli conservati, come riportato nel paragrafo 1.8 di questo capitolo, è estremamente delicata la fase di "riattivazione" dei terreni conservati.

9.2. Oggetto e campo di applicazione
La tecnica può essere applicata a qualsiasi tipo di suolo. La conservazione dei campioni di suolo è necessaria ogni volta che si ritiene opportuno di dover ripetere nel tempo un'analisi sul medesimo campione (es. come controllo rispetto ad un trattamento), o più semplicemente quando le analisi non sono eseguibili direttamente sul luogo di campionamento.

9.3. Principio
Il principio su cui si basa questa tecnica consiste nel conservare in condizioni standard campioni di suolo per periodi di tempo variabili da poche ore a giorni ad anche anni.

9.4. Procedura consigliata

9.4.1. Materiali ed apparecchiature
Per la conservazione di campioni essiccati all'aria:
- recipienti di materiale inerte opachi alla luce e dotati di chiusura ermetica (barattoli in teflon, PVC, vetro, o sacchetti in plastica);
- ambiente fresco e asciutto dotato di scaffali o contenitori per un'idonea schedatura dei recipienti;
- etichette di cartoncino od altro materiale su cui poter scrivere (da evitare etichette adesive il cui collante può nel tempo perdere di adesività);
- penna o pennarello idoneo alla superficie del cartellino o del contenitore scelto.

Per i campioni da conservare refrigerati:
- recipienti di materiale inerte dotati di chiusura ermetica (barattoli in teflon, PVC, vetro, o sacchetti in plastica);
- refrigeratore (+4±2°C) capiente dotato di sistema di allarme per il controllo della temperatura;
- etichette di materiale idrofobo su cui poter scrivere (da evitare etichette adesive il cui collante può non resistere all'umidità e alle basse temperature);
- penna o pennarello idoneo alla superficie del cartellino o del contenitore scelto.

Per i campioni da conservare congelati:
- recipienti di materiale inerte dotati di chiusura ermetica resistenti alle basse temperature (barattoli in teflon, PVC, vetro, o sacchetti in plastica);
- congelatore (-40±2°C) capiente dotato di sistema di allarme per il controllo della temperatura;
- etichette di materiale idrofobo su cui poter scrivere (da evitare etichette adesive il cui collante può non resistere all'umidità e alle basse temperature);

- penna o pennarello idoneo alla superficie del cartellino o del contenitore scelto e con inchiostro resistente alle basse temperature.

9.4.2. Procedimento

Relativamente al procedimento di essiccazione all'aria dei campioni si rimanda al paragrafo 1.7 di questo capitolo.
Per la refrigerazione e per il congelamento è necessario seguire gli accorgimenti di preparazione del campione come indicato nel paragrafo sull'uso del campione fresco (§ 1.6). I campioni devono poi essere riposti in contenitori in grado di resistere alle basse temperature. Nel caso specifico del congelamento alcune plastiche di uso comune si spaccano dopo poco tempo. Alcuni tipi di vetro possono pure non essere sufficientemente resistenti. Nei contenitori destinati al congelamento è bene riporre quantità di campione non eccessive, se il suolo contiene molta acqua si deve, infatti, tenere in considerazione l'aumento di volume di questa.
Particolare attenzione si deve avere nella scelta del tipo di pennarello da utilizzare poiché alcuni inchiostri acrilici dopo qualche tempo alle basse temperature depolimerizzano. E' bene pertanto mantenere unito al campione un cartellino d'identificazione che duri almeno quanto il campione stesso.
Per i campioni essiccati all'aria è necessario predisporre un ambiente fresco e non umido dove riporre i contenitori con i campioni. Questi ultimi devono essere a chiusura ermetica e di materiale scuro, in modo da non esporre il suolo alla luce.

9.4.3. Osservazioni

Esistono metodi diversi di conservazione, ciascuno dei quali possiede pro e contro. I più utilizzati sono la refrigerazione, il congelamento e l'essiccazione all'aria. Secondo il tipo d'esperimento, di analisi e di condizioni di lavoro è opportuno scegliere il metodo di conservazione dei campioni più idoneo.
Il principio da tenere in considerazione è che, secondo la provenienza dei suoli, è possibile ottenere risultati differenti dallo stesso trattamento. Come accennato in altri passaggi di questo capitolo, le comunità microbiche del suolo sono strutturate in funzione delle condizioni ambientali prima e microambientali poi, del particolare ambiente in cui vivono; imporre un regime di resistenza alla comunità (da freddo, nel caso della refrigerazione e del congelamento; da disidratazione, nel caso dell'essiccamento all'aria) è comunque un intervento drastico di cui si deve tenere conto nel corso di un esperimento. Nel caso di confronto fra campioni di diversa provenienza o campionati in tempi differenti, è bene utilizzare sempre lo stesso tipo di conservazione e comunque avere cura, sempre, di riportare (nei protocolli sperimentali, come nei lavori scientifici) gli eventuali metodi di conservazione utilizzati.
Il suolo essiccato all'aria potrà essere conservato, allo scopo di verificarne l'attività microbica, mediamente per cinque/sette anni. Tale periodo è estremamente variabile da suolo a suolo, ed in particolare dipende dal tipo di comunità microbica presente. Come accennato, un suolo di ambienti soggetti ad ampie oscillazioni climatiche sarà caratterizzato da specie di microrganismi in grado di mantenersi in vita in forme dormienti o di resistenza per lunghi periodi (anche dieci anni). Viceversa, suoli di aree temperate o comunque caratterizzate da umidità costante, passando attraverso questo metodo di conservazione, subiranno un trauma sicuramente maggiore e saranno "vitali" per tempi meno lunghi (anche solo due/tre anni ed in alcuni casi anche solo pochi mesi). Purtroppo esistono pochi studi sistematici sulla materia, certo è che sarà bene conservare il suolo unitamente ad una scheda dove i valori dei parametri biochimici e microbiologici di riferimento, corrispondenti cioè a determinazioni effettuate subito dopo la raccolta e la manipolazione (Grisi et al., 1998).
Il suolo refrigerato presenta problemi differenti, a +4°C infatti alcuni terreni continuano a respirare (terreni di climi temperati-freddi) e ad evolversi dal punto di vista della composizione della comunità microbica. I terreni di ambienti mediterranei ad esempio sono talvolta risultati particolarmente sensibili alla conservazione in frigorifero, mantenendosi vitali in questo modo per periodi

relativamente brevi. Il tempo di "vita" medio di un suolo conservato in frigorifero a circa +4°C è di circa due-tre mesi (Vance, 1987).

Per i campioni conservati congelati sono necessarie alcune accortezze specifiche:

1. per evitare di scongelare e ri-congelare più volte il campione, qualora siano previste analisi a più intervalli, è buona norma predisporre più subcampioni rappresentativi in altrettanti contenitori, in modo da procedere allo scongelamento solo di alcuni di essi ed in occasione delle analisi.
2. lo scongelamento deve avvenire in modo graduale e a temperatura ambiente, eventualmente mantenendo il recipiente ancora chiuso sotto un flusso d'acqua corrente fredda (in modo da accelerare il processo per mezzo dello scambio di calore con l'acqua) e mai riscaldando il campione congelato.

10. Bibliografia

Benedetti A., Rossi G., Dell'Abate M.T., Canali S. (1992), *Influenza dell'essiccazione all'aria del terreno sulla misura della respirazione e delle attività deidrogenasiche ed ureasiche*. Atti X Convegno della Società Italiana di Chimica Agraria, Roma, 209-216.

Busoni E., Mecella G. (1997), 3. *Ritenzione idrica*. In: Metodi di Analisi Fisica del Suolo. (Pagliai M., Coordinatore). Franco Angeli Ed. Milano.

Castrignanò A. (1997), 1. *Campionamento*. In: Metodi di Analisi Fisica del Suolo. (Pagliai M., Coordinatore). Franco Angeli Ed. Milano.

Florenzano G. (1983), *Fondamenti di Microbiologia del Terreno*. REDA, Roma.

Grisi B., Grace C., Brookes P.C., Benedetti A., Dell'Abate M.T. (1998), *Temperature effects on organic matter and microbial biomass dynamics in temperate and tropical soils*. Soil Biololy, Biochemistry, Vol. 30, No. 10/11, pp. 1309-1315.

Jensen V. (1962), *Studies on the microflora of Danish beech forest soils. I. The dilution plate count technique for the enumeration of bacteria and fungi in soil.* Zentralblatt für Bakteriologie-II Abteilung, 116, 13-32.

Jones J.G., Simon B.M. (1975), *An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with reference to a new method of dyeing membrane filters*. Journal of Applied Bacteriology, 39, 317-329.

Klute A. (1986), W*ater retention: laboratory methods*. In: Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Methods (Klute A., Ed.), 2nd Edition. American Society of Agronomy, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. Publishers. Madison, Wisconsin USA, pp. 635-662.

Lison L. (1961), *Statistica Applicata alla Biologia Sperimentale*. Ed. Ambrosiana, Milano.

Rossi G., Benedetti A., Dell'Abate M.T. (1992), *Effetto della variazione di temperatura ed umidità sulla respirazione e sul potere mineralizzante di suoli tipici italiani*. Atti X Convegno della Società Italiana di Chimica Agraria, Roma, 421-428.

Stotzky G., Goos R.D., Timonin M.I. (1962), *Microbial changes occurring in soil as a result of storage.* Plant and Soil, 16, 1-18.

Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S. (1987), *An extraction method for measuring soil microbial biomass C.* Soil Biology and Biochemistry, 19, 703-707.

Violante P., coordinatore (1999), *Metodi di analisi chimica del suolo*. Franco Angeli Ed. Milano.

West A.W., Ross D.J., Cowling J.C. (1986), *Changes in microbial C, N, P and ATP contents, numbers and respiration on storage of soil.* Soil Biology and Biochemistry, 18, 141-148.

West A.W., Sparling G.P., Grant W.D. (1987), *Relationships between mycelial and bacterial populations in stored, air dried and glucose-amended arable and grassland soils.* Soil Biology and Biochemistry, 19, 599-605.

II - VALUTAZIONE DELLE CARICHE MICROBICHE E GRUPPI GENERICI

Metodo II.1

PROCEDIMENTO GENERALE PER LE CONTE PER VIA COLTURALE

1. Introduzione
Le conte indirette, possono essere effettuate utilizzando terreni colturali agarizzati (normalmente in piastra) oppure liquidi. Il conteggio del numero di colonie cresciute in piastra permette una determinazione più precisa, quindi, se possibile, è da preferirsi. In vari casi, quali ad esempio per i nitrificanti, la crescita in piastra e la sua rilevazione sono problematiche e per tali motivi è necessario, o almeno consigliabile, il ricorso a terreni colturali liquidi, in cui non possono essere contate delle colonie. In tal caso la rilevazione, attraverso il metodo del MPN (Most Probable Number = numero più probabile), è solo una stima di tipo probabilistico, più imprecisa, della carica.
L'intera procedura d'analisi può essere in ogni caso scomposta in varie fasi:
- allestimento delle diluizioni successive del campione di suolo;
- semina nel terreno colturale;
- incubazione delle colture;
- rilevazione del risultato.

La prima fase comporta la stessa procedura, indipendentemente dal tipo di terreno colturale (liquido o agarizzato). Il terreno colturale, le condizioni di incubazione e la rilevazione del risultato sono generalmente diverse secondo il gruppo microbico.

2. Apparecchiature e materiali
- Bilancia tecnica.
- Frigotermostato regolabile almeno tra –5°C e +70°C.
- Trituratore a lame rotanti, oppure mortaio con pestello o altro apparato per l'omogenizzazione e dispersione del suolo a livello della prima diluizione decimale.
- Giare per incubazione anaerobica: sono disponibili in commercio, assieme ai generatori di anaerobiosi al sodio boroidruro (che richiedono un catalizzatore al palladio) o alla polvere di ferro ed agli indicatori di anaerobiosi al Blu di Metilene.
- Provette o beute vuote per l'allestimento delle diluizioni decimali. Calcolare il volume di ogni diluizione necessario per l'inoculo del o dei terreni colturali; stabilire di conseguenza con quali volumi ottenere le diluizioni 1:10 (vedere successivo 2.3.) tenendo presente che una diluizione decimale può essere ottenuta non solo aggiungendo 9 mL di soluzione disperdente ad 1 mL del materiale, ma anche aggiungendo 18 mL a 2 mL, 27 a 3, ecc. Per volumi di 9 o 18 mL si possono usare provette, per quantità maggiori conviene impiegare delle beute, che tra l'altro permettono un più facile ed efficace rimescolamento del materiale. Per avere una precisione ottimale, la soluzione per effettuare le diluizioni va posta negli appositi recipienti non troppo tempo prima dell'analisi, per evitare diminuzione di volume per evaporazione. Vanno perciò preparati e sterilizzati da un lato i recipienti vuoti e dall'altro la soluzione salina prevista, che verrà trasferita sterilmente mediante pipetta.
- Pipette graduate di appropriate dimensioni, per il trasferimento di soluzioni o sospensioni acquose. Per curare la precisione della procedura d'analisi, ogni trasferimento va fatto, nei limiti del

possibile, con un'unica pipettata e riempendo il più possibile la pipetta: ad esempio, se si devono trasferire 9 mL si userà una pipetta da 10 mL, non da 25 o 5.

- Soluzioni acquose, o acqua distillata, per effettuare le diluizioni decimali; vengono di seguito riportati alcuni esempi di soluzioni adatte allo scopo. Soluzione di pirofosfato: pirofosfato di sodio ($Na_4P_2O_7$) 1 g/L; portare a pH 7 mediante HCl e sterilizzare. Soluzione di Winogradsky diluita 20 volte: in 1 L di acqua distillata, K_2HPO_4 0,25 g; $MgSO_4$ 0,125 g; NaCl 0,125 g; $Fe_2(SO_4)_3$ 2,5 mg; $MnSO_4$ 2,5 mg; portare a pH 7 e sterilizzare a +121°C per 15 minuti.
- Terreni colturali liquidi, in provetta o altro contenitore più adatto secondo i casi.
- Terreni colturali agarizzati. Possono essere preparati e stoccati sterili in beuta in quantità sufficiente per varie piastre, oppure in provette contenenti ognuna la quantità prevista per una piastra (generalmente 20 mL per piastre da 9-10 cm). Quest'ultima soluzione comporta un più consistente impiego di vetreria ma miglior precisione e protezione dall'inquinamento durante l'impiego, che risulta inoltre facilitato. Con lo stoccaggio si può verificare una diminuzione di volume per evaporazione: se necessario (indicativamente se il calo è maggiore del 10%) si può ripristinare il volume iniziale con acqua distillata sterile prima di sciogliere il terreno colturale.
- Piastre Petri, normalmente da 9-10 cm, per la semina dei terreni colturali agarizzati.
- Etichette adesive o pennarelli indelebili, per siglare piastre e provette.

3. Diluizioni successive del campione

- Pesare 10 g del campione di suolo umido ed addizionare 90 mL di soluzione di pirofosfato; volendo essere rigorosi si può valutare il peso specifico del suolo e stabilire di conseguenza il volume esatto di soluzione da aggiungere per arrivare a 100 mL;
- trattare per pochi minuti in un trituratore a lame rotanti;
- allestire le sospensioni-diluizioni 1:10 successive alla prima in soluzione di Winogradsky diluita;
- in ogni caso è importante standardizzare rigorosamente tutta la procedura d'analisi, specie se si devono effettuare confronti fra vari campioni: differenze di procedura apparentemente trascurabili possono provocare insospettate differenze di risultato.

Per il trasferimento di liquidi vanno impiegate pipette graduate di opportuna capacità. Ogni pipetta può essere impiegata per pipettare, anche più volte, la stessa sospensione o soluzione e non può più essere impiegata per le altre. Ogni pipetta va “condizionata”: quando si inizia ad usarla per una determinata sospensione si deve aspirare ad espellere il liquido almeno tre volte, per saturare le cariche elettrostatiche presenti sulla parete. Ogni sospensione va accuratamente dispersa prima dei prelievi, agitando il contenitore e/o soffiando vigorosamente sul fondo dello stesso con la pipetta per far gorgogliare il liquido. Le sospensioni-diluizioni devono essere allestite ed impiegate nel più breve tempo possibile (poche decine di minuti al massimo).

4. Semina in terreno colturale

Per i terreni colturali liquidi la procedura è invariabilmente il pipettaggio di aliquote normalmente unitarie (1 mL) di ogni diluizione in uno o più contenitori (p. es. provette) contenenti il terreno colturale. Per i terreni colturali agarizzati sono invece impiegabili principalmente due procedure:

- semina per inclusione (o diffusione): aliquote generalmente di 1 mL delle sospensioni-diluizioni vengono poste in piastre vuote; il terreno colturale agarizzato viene sciolto a +100°C, raffreddato a +45-50°C e versato nelle piastre; dopo delicato rimescolamento, muovendo la piastra in senso sia rettilineo che rotativo, si lascia solidificare l'agar;
- semina superficiale: il terreno colturale viene sciolto, posto in piastra e lasciato solidificare; aliquote delle diluizioni vengono poi sparse sulla superficie; per favorire il rapido assorbimento, in modo che le cellule microbiche, quando iniziano a dividersi, si trovino immobilizzate sul mezzo solidificato, si possono porre le piastre ad esempio a +37°C per almeno un giorno o a +60°C per

circa un'ora prima della semina e seminare su ogni piastra soli 0,1-0,2 mL di una determinata diluizione.

In ogni caso le piastre (da una a tre per ogni diluizione) vanno poi capovolte per evitare ricaduta di condensa (Fig. 1). La semina superficiale dovrebbe garantire una più diretta ossigenazione dei microrganismi aerobi ed evitare ai microrganismi eventuali shock termici; una maggior complessità della procedura tuttavia non sembra portare significativi vantaggi, anche per batteri aerobi obbligati per cui proponiamo di riservare la semina superficiale a casi con esigenze particolari.

Per i terreni colturali liquidi (Fig. 2) si seminano normalmente tre o cinque provette per ogni diluizione. Più piastre o provette si seminano per ogni diluizione, maggiore è la precisione della determinazione finale, per elementari considerazioni di carattere statistico.
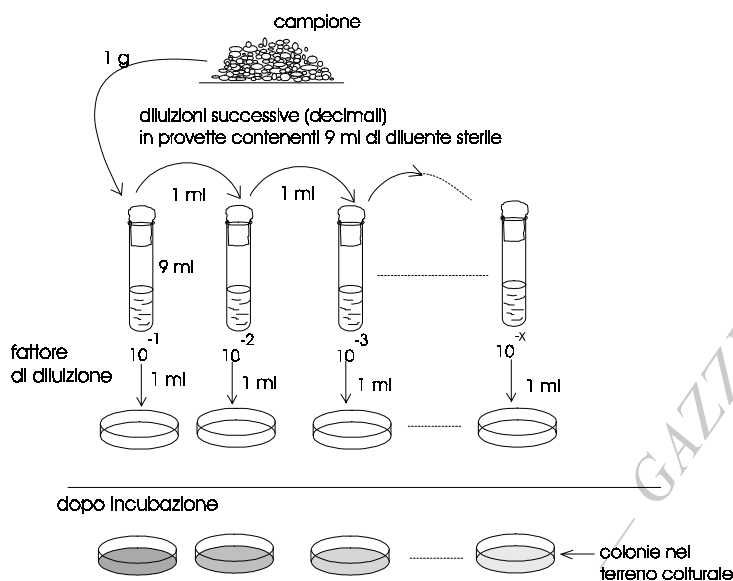
Fig. 1 - Schema di procedura per la conta in piastra
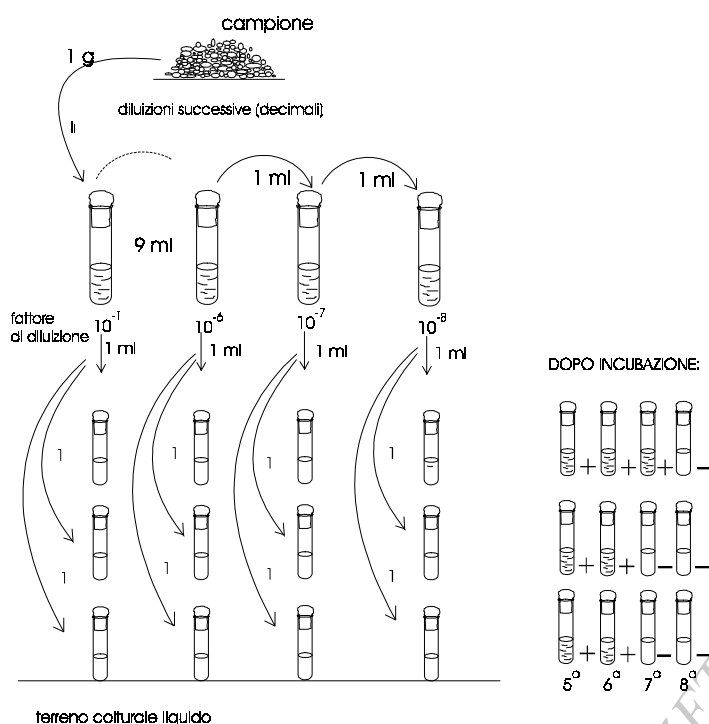
Fig. 2 - Schema di procedura per la determinazione della carica microbica con terreno colturale liquido ed esempio di un possibile risultato.

5. Incubazione

Le condizioni di incubazione (temperatura, tempo, presenza di aria o anaerobiosi, luce o buio) devono essere quelle ottimali per il gruppo microbico ricercato e quindi da esso dipendono. Il valore più opportuno secondo i vari autori risulta essere tra +20 e +30°C; è preferibile non superare quest'ultimo livello. Nei nostri suoli temperati sono evidentemente predominanti i microrganismi mesofili: quelli di origine ambientale hanno un optimum di temperatura attorno ai +25°C (per quelli di origine intestinale sono più adatti i +36°C circa). Si consiglia perciò in linea di massima l'adozione dei +28°C, già considerati in molti laboratori come valore standard per l'incubazione dei mesofili ambientali.
Nel caso di ambienti o di ricerche particolari, quando l'interesse sia rivolto non ai mesofili ma ad eventuali psicrofili o termofili, si deve tener conto che la temperatura ottimale per la crescita è diversa: circa +15°C per i primi (temperatura che d'altra parte permette la crescita di vari mesofili), circa +55°C per i secondi. Gli psicrofili sono comunque in grado di crescere anche a pochi gradi sopra lo zero.
Le stesse considerazioni circa condizioni particolari di crescita, valgono quando, in casi particolari, si abbia a che fare con "estremofili" quali gli alofili (che prediligono alta salinità), gli acidofili o alcalofili (riguardo al pH), ecc.
Nel caso di incubazioni prolungate, ed in ogni caso per le piastre, in cui lo spessore del terreno colturale è limitato a pochi millimetri, si deve evitare una sensibile disidratazione che può danneggiare la crescita ottimale e disturbare il conteggio delle colonie: è perciò necessario, una volta sicuri dell'evaporazione di eventuale condensa formatasi sul terreno colturale nelle prime ore di incubazione, incubare in presenza del 100% di umidità, pur dovendo garantire, nel caso degli aerobi, un continuo apporto di ossigeno.

6. Rilevamento dei risultati

Le modalità di rilevazione dei risultati di un'analisi per il calcolo della carica sono completamente diverse per i terreni colturali agarizzati rispetto a quelli liquidi. In ogni caso, se si è seminata in ogni piastra o provetta un'aliquota diversa da 1 mL delle varie diluizioni, si deve correggere di conseguenza il valore di carica rilevato: p. es., se la semina è stata di 0,5 mL, cioè di 1/2 dell'aliquota unitaria, l'MPN o il risultato del conteggio in piastra riferito ad una certa diluizione va moltiplicato per 2.
La carica microbica, con qualunque via sia stata determinata, risulta riferita a grammo per peso umido, essendo il suolo in stato di inumidimento quando viene pesato per allestire la prima diluizione. Nel caso del suolo si usa tuttavia riferire il risultato a grammo di peso secco, per renderlo indipendente dal grado di umidità contingente. Questo è possibile determinando, in parallelo all'analisi, il grado di umidità del suolo, mediante essiccazione in stufa a +105°C per 24 h.

6.1. Conta in piastra

6.1.a. Si rileva il numero di colonie cresciute dopo un periodo di incubazione sulle piastre dove le colonie non siano così numerose da sovrapporsi o anche solo così vicine da potersi ostacolare nella crescita. Il numero non deve essere troppo limitato poiché la variabilità statistica sarebbe molto alta (quindi la precisione della conta bassa) ed eccessiva l'influenza di qualche inquinante estraneo cresciuto. Si consiglia di assumere come validi un numero di colonie attorno alla decina e non andare comunque oltre le poche decine per piastra. Il pericolo di sottovalutazione delle cariche può essere individuato confrontando piastre di diluizioni diverse (quello di eccessiva imprecisione di piccoli numeri, paragonando le varie piastre ottenute da una stessa sospensione-diluizione). Per verificare la buona esecuzione dell'analisi, controllare sempre la sufficiente omogeneità dei conteggi sulle diverse piastre della stessa diluizione, eventualmente per via statistica (Cavalli-Sforza, 1966) e confrontare le conte relative alle diverse diluizioni 1:10.

6.1.b. Una volta individuate le piastre da considerare, appartenenti ad una o più diluizioni, la formula più generale per calcolare correttamente la carica è:

$$\text{carica batterica} = \frac{C}{\sum n \cdot z}$$

dove: C = numero di colonie contate sulle varie piastre considerate, indipendentemente dalla diluizione, z = fattore di diluizione (=10^{-x}) ed n = numero di piastre di ognuna delle diluizioni (Cavalli-Sforza, 1966). Per esempio, se si è deciso di calcolare la carica basandosi su due piastre della 10^{-6} e tre con 10^{-7}, il denominatore sarà: $2 \times 10^{-6} + 3 \times 10^{-7}$. Nel caso si consideri una sola diluizione, l'applicazione della formula si risolve nel semplice calcolo della media aritmetica delle conte, da rapportare al fattore di diluizione.

6.2. Conteggio in terreni colturali liquidi (MPN)

6.2.a. Si dovrà rilevare, su ognuna delle provette inoculate con ognuna delle sospensioni-diluizioni di suolo, se si è verificata o no crescita dei microrganismi ricercati. Il criterio per assegnare tale positività o negatività di crescita varia secondo il gruppo ricercato e il terreno colturale (ved. capitoli specifici).

6.2.b. Si registra il risultato dell'analisi sotto forma di tabella inserendo i segni + e –. Per stimare la carica microbica si ricorre alla tecnica del MPN: si individua un codice numerico ("numero caratteristico"), che corrisponde biunivocamente alla tabella di positività e negatività, ed in base a tale codice una apposita tabella del MPN o di McCrady, diversa secondo il n° repliche/diluizione (Tabb. 1 e 2), fornisce la stima della carica riferita ad una determinata diluizione. Dividendo il dato per il fattore di diluizione (10^{-x}) si ottiene la carica (MPN) per grammo di suolo.

6.2.c. La procedura dettagliata è la seguente:

- individuare la diluizione più spinta per la quale tutte le repliche sono risultate + (nell'esempio in Fig. 2, la 10^{-6}): questa è la diluizione di riferimento; nel caso che alla prima diluizione inoculata corrispondano già delle negatività, si adotta tale diluizione come riferimento;
- se ad una sola diluizione corrispondono provette sia + che –, ai fini del calcolo si considerano la diluizione di riferimento (tutta +) e le due successive; il numero caratteristico è formato dal numero di positività in queste tre diluizioni; la tabella del MPN in corrispondenza al numero caratteristico fornirà un numero di microrganismi, che andrà diviso per il fattore di diluizione corrispondente alla diluizione di riferimento per ottenere la carica (nel caso dell'esempio, in base alla tabella per 3 provette/diluizione la carica risulta: $4{,}5/10^{-6} = 4{,}5 \times 10^{6}$/g);
- se due diluizioni successive hanno ognuna provette sia + che –, si determina dapprima la carica in base alle tre diluizioni in cui è compresa l'ultima diluizione tutta +, con la procedura del punto precedente; si determina poi un secondo MPN, considerando le tre diluizioni, che differiscono dalle precedenti per un fattore di diluizione, in cui è compresa la prima diluizione tutta -; la carica ricercata è la media logaritmica di questi due MPN (generalmente tuttavia questi risultano coincidere e la procedura risulta così semplificata);
- se più di due diluizioni hanno + e – si devono sospettare inconvenienti o errori nell'esecuzione dell'analisi, che, se possibile, deve essere ripetuta; l'MPN non è comunque calcolabile.

Numero caratteristico	Numero di microrganismi	Numero caratteristico	Numero di microrganismi	Numero caratteristico	Numero di microrganismi
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,5	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

Tab. 1 - Tabella per la determinazione del MPN con 3 provette/diluizione.

Il n° di microrganismi si riferisce ad 1 mL della diluizione di riferimento.

Numero caratteristico	Numero di microrganismi	Numero caratteristico	Numero di microrganismi	Numero caratteristico	Numero di microrganismi	Numero caratteristico	Numero di microrganismi
000	0,0	203	1,2	400	1,3	513	8,5
001	0,2	210	0,7	401	1,7	520	5,0
002	0,4	211	0,9	402	2,0	521	7,0
010	0,2	212	1,2	403	2,5	522	9,5
011	0,4	220	0,9	410	1,7	523	12,0
012	0,6	221	1,2	411	2,0	524	15,0
020	0,4	222	1,4	412	2,5	525	17,5
021	0,6	230	1,2	420	2,0	530	8,0
030	0,6	231	1,4	421	2,5	531	11,0
100	0,2	240	1,4	422	3,0	532	14,0
101	0,4	300	0,8	430	2,5	533	17,5
102	0,6	301	1,1	431	3,0	534	20,0
103	0,8	302	1,4	432	4,0	535	25,0
110	0,4	310	1,1	440	3,5	540	13,0
111	0,6	311	1,4	441	4,0	541	17,0
112	0,8	312	1,7	450	4,0	542	25,0
120	0,6	313	2,0	451	5,0	543	30,0
121	0,8	320	1,4	500	2,5	544	35,0
122	1,0	321	1,7	501	3,0	545	45,0
130	0,8	322	2,0	502	4,0	550	25,0
131	1,0	330	1,7	503	6,0	551	35,0
140	1,1	331	2,0	504	7,5	552	60,0
200	0,5	340	2,0	510	3,5	553	90,0
201	0,7	341	2,5	511	4,5	554	160,0
202	0,9	350	2,5	512	6,0	555	180,0

Tab. 2 - Tabella per la determinazione del MPN con 5 provette/diluizione.
Il numero di microrganismi si riferisce ad 1 mL della diluizione di riferimento.

6.2.d. Un caso particolare di impiego dell'MPN è quello del conteggio dei rizobi mediante test di inoculazione di piante sensibili, per il quale si rimanda al capitolo specifico.

7. Elaborazione statistica dei risultati

Se si analizza più volte ogni campione da confrontare con altri (p. es. un suolo trattato rispetto allo stesso non trattato) la variabilità statistica su cui basare il giudizio è calcolabile dai dati ottenuti ed esprimibile con parametri statistici quali deviazione standard, intervallo di confidenza, ecc. In tal caso si possono applicare, per il confronto, delle appropriate e sensibili tecniche statistiche quali l'analisi della varianza, per le quali si rimanda ai numerosi manuali di statistica.

Se si dispone di una sola determinazione per ogni campione, il confronto è problematico perché non si può stimare dai propri dati sperimentali la variabilità casuale effettiva. Gli statistici tuttavia, in base all'esame delle metodiche sperimentali, hanno fornito delle procedure di calcolo della variabilità associabile ad una singola determinazione, ad esempio sotto forma di intervallo di confidenza (p. es., Cochran 1950 per l'MPN, Cavalli-Sforza 1966 per la conta in piastra). Il criterio per affermare che esiste una effettiva differenza può essere in tal caso di verificare la non sovrapposizione degli intervalli di confidenza dei due valori sperimentali ottenuti.

Tale valutazione su base teorica tuttavia non può normalmente tener conto di tutte le fonti di variabilità realmente in gioco (variabilità di campionamento, effetto combinato delle inevitabili imprecisioni nelle manipolazioni durante l'analisi, ecc.), che risultano viceversa stimabili nel caso che

si disponga dei risultati di più repliche d'analisi. La variabilità reale rischia perciò di essere sottostimata ed il giudizio sull'effettivo significato delle differenze riscontrate risulta discutibile. Come criterio indicativo di riferimento, ed in base a calcoli statistici su dati di carica dell'ordine di milioni ottenuti nell'ambito della nostra esperienza pratica, si consiglia comunque di considerare come effettivamente differenti solo singole determinazioni che stiano fra loro in rapporto di almeno 2 o 3:1 se derivanti da conte in piastra, almeno 10 o 15:1 se sono MPN da quintupla o tripla serie di provette.

8. Bibliografia

Cavalli-Sforza L. (1966), *Analisi Statistica per Medici e Biologi*. Boringhieri, Torino.

Cochran W.G. (1950), *Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number"*. Biometrics, 6, 105-116.

Metodo II.2

GRUPPI GENERICI DI MICRORGANISMI

1. Introduzione
Il presente capitolo tratta della determinazione per via colturale delle cariche dei due gruppi di microrganismi preponderanti come entità di popolazione nel suolo, cioè i batteri e gli eumiceti intesi come funghi filamentosi (o muffe, per usare un termine del linguaggio comune) e lieviti. Un terzo gruppo generico che molte volte viene considerato separatamente, quello degli attinomiceti in senso lato, è in realtà da considerare un sottogruppo dei batteri o schizomiceti. Come già accennato, date le diversificate caratteristiche fisiologiche dei microrganismi non si possono con metodi semplici effettuare conte totali più generali di quelle dei seguenti gruppi:

- batteri aerobi (batteri eterotrofi aerobi obbligati + batt. eter. anaerobi facoltativi)
- batteri anaerobi (batt. eter. anaerobi facoltativi + batt. eter. anaerobi obbligati)
- eumiceti (muffe e lieviti, eventualmente poi diversificati in base all'aspetto della colonia)

Il proposito di ottenere la crescita di tutti gli appartenenti ad un gruppo microbico su di un unico terreno colturale, per quanto accuratamente elaborato, può tuttavia escludere forme troppo specializzate fisiologicamente, ma soprattutto la modalità di crescita che si usa definire saprofitica esclude le forme obbligatoriamente parassite/predatrici (p. es. il batterio *Bdellovibrio*) o simbionti. Per taluni di questi batteri o eumiceti si rimanda ai capitoli successivi.

2. Batteri aerobi ed anaerobi

2.1. Terreno colturale
2.1.a. Estratto di suolo: si sceglie un suolo incolto o di giardino dal pH neutro, in buono stato e non trattato con sostanze estranee, quindi si addiziona acqua non inquinata o trattata con disinfettanti in rapporto 1:1 in peso; si tratta in autoclave a +130°C per 1 h senza lasciare il miscuglio ad alta temperatura oltre il tempo necessario (Pochon & Tardieux, 1962). Si effettua dapprima una filtrazione su strato di cotone idrofilo, ripassando almeno una volta il primo filtrato sullo strato di suolo depositato sul cotone, poi si centrifuga a velocità sufficiente (p. es., 5000 x *g* per 20 minuti) per ottenere completa chiarificazione del filtrato.

2.1.b. Preparazione del terreno colturale: in 1 litro di estratto di suolo si sciolgono 1 g di D-glucosio, 1 g di estratto di lievito e 15 g di agar (Allievi & Möller, 1992), quindi si porta il valore del pH a 7,5 circa e si sterilizza a +121°C per 15 minuti.; con la sterilizzazione il pH diminuisce.

2.2. Procedura consigliata
2.2.a. Sia per i batteri aerobi che per i batteri anaerobi, si seminano in piastra per inclusione aliquote di 1 mL delle diluizioni successive 1:10 del campione, normalmente dalla 10^{-4} alla 10^{-9} per gli aerobi e dalla 10^{-3} alla 10^{-8} per gli anaerobi, impiegando il terreno colturale all'estratto di suolo.

2.2.b. Incubare le piastre a +28°C capovolte, fino al raggiungimento del massimo numero di colonie cresciute. Se non è possibile prevedere periodiche rilevazioni, standardizzare il tempo di incubazione a 15-30 giorni. Per il totale anaerobi è necessario incubare in anaerobiosi rigorosa per evitare la crescita di aerobi microaerofili.

3. Attinomiceti

3.1. Preparazione del campione
3.1.a. Il campione di suolo fresco destinato alla conta degli attinomiceti (1 o 10 g da sospendere rispettivamente in 9 o 90 mL di acqua distillata sterile) deve essere essiccato a temperatura ambiente sino al raggiungimento del peso costante all'interno di un recipiente protetto con una garza in luogo areato e ombroso. Questo semplice trattamento riduce già in modo consistente la vitalità dei batteri unicellulari.

3.1.b. Un maggior abbattimento della componente batterica tradizionale può essere conseguito mediante trattamento termico del campione che può essere blando (1 h a +55-58°C) o estremamente drastico (1 h a +120°C a secco) quando sono ricercate particolari forme di questi organismi (Nonomura & Hayakawa, 1988).

3.2. Substrati di isolamento preferenziali
3.2.a. Terreno Agar Amido Caseina: amido solubile 10 g, caseina 0,30 g, KNO_3 2 g, NaCl 2 g, K_2HPO_4 2 g, $MgSO_4$ 0,05 g, $CaCO_3$ 0,02 g, $FeSO_4$ 0,01 g, bacto-agar 18 g, 1 L di acqua distillata. Per il contenimento delle forme fungine vengono addizionati al substrato, già sterilizzato e prima della piastratura, nistatina e actidione alla dose di 50 ppm ciascuno. Soluzioni concentrate dei due antibiotici devono perciò essere previamente sterilizzate mediante filtrazione amicrobica con apposito filtro dalla porosità di 0,2 micron.

3.2.b. Terreno Agar Chitina: per la preparazione di questo substrato 5 g di chitina vengono posti in 50 mL di HCl concentrato, agitati per 30 minuti e versati lentamente in 250 mL di acqua di rubinetto a +5°C. Quindi si filtra su carta Whatman n° 1 e si lava con acqua il residuo. La chitina recuperata sul filtro vene posta in 250 mL di acqua di rubinetto e ben agitata. Si procede quindi ad una ulteriore filtrazione. Questa operazione deve essere ripetuta più volte, sino a che il pH dell'acqua di lavaggio non raggiunge valori compresi tra 3,5 e 4. L'ultimo lavaggio è effettuato attraverso un setaccio con maglie di 0,5 mm. Si porta il filtrato a 1 L con acqua di rubinetto ed il pH viene corretto a 7. Si addizionano 12 g di bacto-agar e si sterilizza normalmente in autoclave. Prima della piastratura vengono addizionati gli antibiotici sopracitati con le stesse modalità.

3.2.c. Terreno Agar Acqua: si prepara fondendo 25-30 g di bacto-agar in un litro di acqua distillata e aggiungendo actidione e nistatina come nei substrati precedenti.

3.2.d. In condizioni operative normali il pH dei substrati deve essere neutro. L'impiego di substrati con pH molto acido (4,5-5) o molto alcalino (8,5-9) è previsto nella ricerca delle forme acidofile o alcalofile di questi organismi.

3.3. Preparazione e inoculo delle piastre
3.3.a. La ricerca degli attinomiceti è condotta generalmente alle diluizioni 10^{-4}-10^{-7} del campione, ponendo l'aliquota delle relative diluizioni (0,1-0,2 mL) sulla superficie agarizzata della piastra e distribuendola uniformemente mediante una spatolina di vetro sterile. Al fine di contenere lo sviluppo dei batteri unicellulari è vantaggioso operare con la superficie agarizzata delle piastre asciutta. Pertanto le piastre Petri devono essere allestite almeno 24 h prima dell'analisi e lasciate a temperatura ambiente sotto cappa a flusso laminare oppure si deve asciugarne la superficie ponendole in stufa a +45-50°C per alcune ore.

3.3.b. Sempre allo scopo di limitare lo sviluppo di batteri non desiderati, risulta utile un trattamento termico delle piastre (+110°C per 10 minuti.) subito dopo la distribuzione delle sospensioni sulla

superficie agarizzata. Le piastre vanno poi incubate in termostato a +26-28°C ponendole capovolte per evitare la caduta di gocce di condensa dal coperchio sulle colonie.

3.4. Conteggio delle colonie
3.4.a. Le colonie degli attinomiceti sono tondeggianti, di diametro ridotto (2-5 mm) con aspetto polverulento e intensa e varia colorazione del micelio sia aereo che vegetativo, spesso associata alla produzione di pigmenti solubili. All'osservazione in trasparenza il margine della colonia risulta normalmente sfumato.

3.4.b. Il conteggio delle colonie degli attinomiceti va eseguito due volte. La prima dopo 7 giorni di incubazione, segnando sul retro delle piastre le colonie presenti alla diluizione del campione a cui la lettura risulta ottimale (da 20 a 100 colonie per piastra). La seconda, possibilmente dopo 14 giorni di incubazione, allo scopo di individuare la presenza di eventuali colonie a crescita più lenta. Al numero delle Unità Formanti Colonie per grammo di campione (UFC/g) si risale applicando la procedura già descritta.

4. Funghi filamentosi e lieviti

4.1. Terreno colturale
3.4.1.a. Impiegare l'Agar Malto (disponibile anche già pronto in commercio): estratto di malto in polvere 30 g, agar 20 g, acqua distillata 1000 mL; regolare il pH a 5,4, sterilizzare a +121°C per 15 minuti.

3.4.1.b. Se si usa cloramfenicolo come antibatterico, addizionarlo alla concentrazione di 100 mg/L al terreno colturale prima della sterilizzazione. Se si usa un prodotto sensibile al calore, va sterilizzato per filtrazione amicrobica e aggiunto in piastra prima di colare 15 mL di terreno di coltura agarizzato e raffreddato a circa +50°C. Ad esempio, preparare una soluzione di clorotetraciclina in acqua distillata in rapporto di 3 mg di antibiotico per 1 mL H_2O, filtrare con apposito filtro con porosità di 0,2 micron e pipettare in ogni piastra 0,5 mL della soluzione sterile.

3.4.1.c. È da notare che per il conteggio degli eumiceti è diffusamente impiegato, perlomeno in ambiente medico, il Sabouraud Agar. In campo ambientale tuttavia esso non risulta fornire conte maggiori rispetto all'Agar Malto, che d'altra parte permette una migliore evidenziazione della morfologia eumicetica.

4.2. Procedura consigliata
4.2.a. Seminare in piastra per inclusione aliquote di 1 mL delle diluizioni successive 1:10 del campione, normalmente dalla 10^{-3} alla 10^{-7}, impiegando Agar Malto.

4.2.b. Incubare le piastre a +28°C capovolte. Effettuare un conteggio preliminare dopo 3 giorni, segnando sulla piastra con pennarello indelebile la posizione delle colonie, per invasività di alcune forme. Il conteggio definitivo va previsto ad una settimana d'incubazione, tempo normalmente sufficiente.

4.2.c. Se sono individuabili colonie che ricordano i lieviti (colonie simili alle batteriche, mucose se in superficie) se ne può effettuare una conta separata. E' comunque consigliabile qualche controllo microscopico per avere la sicurezza di avere a che fare effettivamente con lieviti: la loro cellula è tipicamente ovoidale, più o meno allungata, di dimensioni (decine di micron) nettamente maggiori di quella dei batteri e spesso mostra la tipica divisione per gemmazione (la cellula figlia che si forma e poi separa è di dimensioni minori di quella da cui origina). Esistono tuttavia anche delle forme

fungine, definite comunemente "pseudolieviti", dalla morfologia intermedia fra i lieviti e la forma miceliare, dipendente anche dalle condizioni colturali.

5. Bibliografia

Allievi L., Möller F. (1992), *A method based on plate count for enumerating N_2O/N_2-producing bacteria from nitrate in the soil*. Journal of Basic Microbiology, 32, 291-298.

Nonomura H., Hayakawa M. (1988), *New method for the selective isolation of soil actinomycetes*. In: Biology of Actinomycetes '88 (Y. Okami, T. Beppu and H. Ogawara, Eds.), Japan Scientific Press, pp. 288-293.

Pochon J., Tardieux P. (1962), *Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol*. Editions De La Tourelle, St.Mandé, France.

III - GRUPPI FISIOLOGICI DI MICRORGANISMI

Metodo III.1

MICRORGANISMI DEL CICLO DELL'AZOTO BATTERI AZOTOFISSATORI LIBERI, AEROBI ED ANAEROBI

1. Introduzione
La flora microbica implicata nel ciclo dell'azoto è numerosa e complessa, comprendendo specie saprofite ed ubiquitarie ed altre dotate di elevata specificità, come ad esempio gli azotofissatori ed i chemiolitotrofi aerobi nitrosanti e nitricanti.
Alcuni gruppi di batteri, dalle diversificate caratteristiche fisiologiche generali, contengono alcune specie che sono in grado di azotofissare non in simbiosi: *Azotobacteraceae, Bacillus, Clostridium*, enterobatteriacee, micobatteri e corinebatteri, spirilli, tiobacilli, fotosintetici anaerobi (batteri rossi o verdi), cianobatteri (o alghe azzurre, fotosintetici ossigenici) ed altri gruppi minori (Dalton, 1980). Tali batteri sono accomunati dalla capacità di sintetizzare l'enzima nitrogenasi, in grado di ridurre N∑N a NH_3 che viene utilizzata per la biosintesi dell'azoto organico. Si ritiene tuttavia che nelle normali condizioni del suolo nei nostri climi abbiano importanza, in quanto agiscono effettivamente e attivamente come N-fissatori, soprattutto le *Azotobacteraceae Azotobacter* e *Azomonas*, aerobie, e gli anaerobi *Clostridium*.
Una tecnica specifica e sufficientemente semplice per ricercare la capacità N-fissatrice è il "test di riduzione dell'acetilene" ad etilene: la nitrogenasi è un enzima non completamente specifico per N_2, può ridurre anche altri composti ed in particolare CH∑CH a CH_2=CH_2. La determinazione della capacità di ridurre C_2H_2 (ARA=acetylene reduction assay) è quindi un metodo indiretto per verificare che si può avere azotofissazione e che ci si trova di fronte ad un potenziale N-fissatore. Si tratta di incubare la coltura, o il campione studiato, in un recipiente sigillato in cui è presente acetilene. La rilevazione dell'etilene prodotto viene effettuata per via gascromatografica (Turner & Gibson, 1980).
Tale tecnica tuttavia è più adatta a determinazioni di attività N-fissatrice (p. es. di colture pure o di campioni di suolo come tali) che alla ricerca della carica batterica, ad esempio tramite MPN. La difficoltà risiede non tanto nel doversi basare su rilevazioni gascromatografiche invece che di più semplice natura, quanto nell'elevato numero di rilevazioni necessarie per ogni singola carica, che comporta tempi eccessivamente lunghi. Queste considerazioni spiegano perché, nonostante siano effettivamente impiegate metodiche di conta basate sul test ARA, vengono ancora consigliati ed applicati metodi più tipicamente microbiologici ai fini della determinazione della carica, quale l'impiego di terreni colturali selettivi. In quest'ottica viene qui proposta la ricerca degli *Azotobacter*, i più tipici tra gli aerobi nei nostri suoli, e dei *Clostridium* per gli anaerobi.
Per la ricerca di *Azotobacter* sono stati proposti terreni colturali contenenti mannitolo, ad esempio l'Agar Ashby. Alcune ricerche hanno tuttavia evidenziato che si ottengono cariche più alte con l'impiego di glucosio quale fonte di carbonio. Inconvenienti sorgono dal sottoporre al calore della sterilizzazione, congiuntamente, fosfato e glucosio, perciò è stata proposta la sterilizzazione separata (Thompson, 1989).

1.1. Terreno colturale di Brown (Thompson, 1989)
In g/L di H_2O distillata, D-glucosio 5 g, K_2HPO_4 0,8 g, $MgSO_4$•7 H_2O 0,2 g, $FeSO_4$•7 H_2O 0,04 g, Na_2MoO_4•2 H_2O 0,005 g, $CaCl_2$ anidro 0,15 g, agar 15 g; pH = 6,8, sterilizzazione a +121°C per 15 minuti. Glucosio e fosfato vengono sciolti in una piccola parte dell'acqua, sterilizzati per filtrazione e aggiunti in piastra prima di colarvi il terreno colturale.

1.2. Terreno colturale secondo Augier (1957)
Per litro di acqua distillata, KH_2PO_4 0,75 g, D-glucosio 10 g, estratto di suolo (ved. Parte II, 3.2.1.a) 10 mL, $CaCO_3$ 0,05 g, fenosafranina (0,2% in H_2O) 8 mL, soluzione di oligoelementi 1 mL, soluzione di Winogradsky 50 mL, NaOH 0,1 N 33 mL circa. La soda decinormale può essere aggiunta al terreno già completato, fino a raggiungimento di un pH vicino alla neutralità. Il terreno colturale va distribuito in provette di circa 16 mm di diametro, 10 mL ciascuna. Aggiungere una campanella Durham in ogni provetta e passare in autoclave a vapore fluente (+100°C) per 20 minuti Dopo raffreddamento del liquido la campanella non deve più contenere bolle d'aria.

1.3. Soluzione di oligoelementi (Pochon & Tardieux, 1962)
Disciogliere in 1 litro di acqua distillata 50 mg ciascuno di
$K_2MoO_4 \bullet 5H_2O$, $Na_2B_4O_7 \bullet 10\ H_2O$, $Co(NO_3)_2 \bullet 6H_2O$, $MnSO_4$, $CdSO_4$, $CuSO_4 \bullet H_2O$, $ZnSO_4 \bullet 7H_2O$ e 100 mg di $FeCl_3$; può essere stoccata non sterile. Far passare una corrente di CO_2 nella soluzione.

1.4. Soluzione di Winogradsky (Pochon & Tardieux, 1962)
Disciogliere in 1 litro di acqua distillata: $K_2HPO_4$5 g, $MgSO_4$2,5 g, NaCl 2,5 g, $Fe_2(SO_4)_3$ 50 mg, $MnSO_4$50 mg, soluzione di oligoelementi 1 mL; sterilizzare quindi a +110°C per 20 minuti.

1.5. Procedura consigliata per gli N-fissatori aerobi (Azotobacter)
Si utilizza un terreno colturale agarizzato in cui non è presente azoto combinato, il terreno di Brown. Effettuare una semina superficiale di aliquote di 0,2 mL delle diluizioni da 10^{-1} a 10^{-6}. Incubare a +28°C per 7 giorni. Può essere utile una rilevazione preliminare a 3 giorni
Dato che la selettività del terreno colturale viene inficiata da tracce di N minerale o organico presenti nell'inoculo nonché nei componenti del terreno colturale, in particolare nell'agar, è necessaria una verifica dell'aspetto della colonia e della morfologia della cellula batterica per essere sicuri di rilevare *Azotobacter* e non eventuali non azotofissatori. In particolare alcuni "oligonitrofili" possono formare colonie anche di qualche mm sfruttando semplici tracce di N combinato; un miglioramento del risultato può essere ottenuto impiegando agar particolarmente purificati.
Aspetto della colonia di *Azotobacter*: biancastra, mucosa, lucida, da pochi fino a 10 mm di grandezza; le colonie iniziano a comparire dopo pochi giorni, spesso col tempo assumono una particolare colorazione (p. es. marrone/nerastra nel caso di *A. chroococcum*, uno dei più comuni). Aspetto della cellula batterica (microscopio a contrasto di fase): tondeggiante o ovoidale, dimensioni di qualche micron (un po' più grande della maggioranza dei batteri a cocco ma nettamente meno dei lieviti), presenza di granulazioni chiare all'interno e di un alone chiaro dovuto a polisaccaridi escreti all'esterno.

1.6. Procedura consigliata per gli N-fissatori anaerobi (Clostridium)
Per i clostridi sono sconsigliabili terreni colturali agarizzati per l'invasività delle colonie e perché il gas prodotto rompe o solleva facilmente l'agar. Viene quindi impiegato un terreno colturale liquido, secondo Augier, pressoché privo d'azoto combinato, contenente un indicatore di potenziale redox ed una campanella di Durham che permette di rilevare la produzione di gas (prevalentemente H_2). Seminare aliquote di 1 mL delle diluizioni successive del campione, da 10^{-1} a 10^{-9}. Incubare in anaerobiosi a +28°C per 30 giorni.
Il criterio per stabilire se si è avuta crescita di clostridi azotofissatori è la presenza di una consistente bolla di gas (almeno mezzo centimetro d'altezza) nella campanella oppure il viraggio della fenosafranina, originariamente rossa. In genere queste due eventualità si verificano assieme. Un controllo microscopico del materiale sul fondo della provetta mostra normalmente la presenza delle tipiche cellule di clostridi, con spora più grande della cellula vegetativa, ma in alcuni casi la crescita non è sufficiente per permettere tale rilevazione.

2. Bibliografia

Augier J. (1957), *A propos de la fixation biologique de l'azote atmosphérique et de la numération des Clostridium fixateurs dans les sols.* Annales de l'Institut Pasteur, 92, 817-824.

Dalton H. (1980), *The cultivation of diazotrophic microorganisms*. In: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation (F.J. Bergersen, Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, U.K., pp. 13-64.

Pochon J., Tardieux P. (1962), *Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol*. Editions De La Tourelle, St.Mandé, France.

Thompson J.P. (1989), *Counting viable Azotobacter chroococcum in vertisols. II. Comparison of media.* Plant and Soil, 117, 17-29.

Turner G.L., Gibson A.H. (1980), *Measurement of nitrogen fixation by indirect means.* In: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation (F.J. Bergersen, Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, U.K., pp. 111-138.

Metodo III.2

BATTERI IN ASSOCIAZIONI DIAZOTROFE (*AZOSPIRILLUM*)

1. Introduzione
I batteri appartenenti al genere *Azospirillum* proliferano nella rizosfera di numerose graminaceae di climi tropicali, subtropicali e temperati.
Sono batteri Gram negativi con lunghezza compresa tra i 2 ed i 4 µm e 1 µm di diametro, presentano forma vibroide, ma possono assumere in certe condizioni una forma a spirale. Essi hanno un movimento vorticoso per la presenza di un singolo flagello polare; tuttavia le specie *A. brasilense, A. lipoferum* ed *A. irakense*, se cresciute in mezzo agarizzato, possono presentare numerosi flagelli laterali. All'interno di tali batteri sono presenti granuli di poli-ß-idrossibutirrato (PBH) e le specie *A. brasilense* ed *A. lipoferum* sono capaci di produrre carotenoidi responsabili della colorazione rosa tipica delle colture vecchie. La crescita ottimale avviene ad una temperatura compresa tra i +32-35 °C e ad un pH vicino alla neutralità. Tutte le specie del genere *Azospirillum* sono capaci di fissare l'azoto in condizioni di microaerofilia, a causa della mancanza di un sistema di protezione del complesso nitrogenasico dall'ossigeno, ad un optimum di pO_2 compreso tra 0,003 e 0,008 atm. Il contenuto di G+C del genoma di tali batteri varia da specie a specie ed è compreso tra 66 e 70 mol % (Elmerich et al., 1992).

2. Materiali ed apparecchiature
1. Cappa a flusso laminare, mortaio e pestello, bisturi con manico di metallo, pinzette metalliche, bilancia, provette di vetro, tubi in vetro da 15 mL con tappo a tenuta d'aria in gomma butilica o silicone, piastre sterili, ansa, pipette graduate sterili da 1,5 e 10 mL, siringhe, termostato, bombola di C_2H_2, gascromatografo dotato di rivelatore ad ionizzazione di fiamma.
2. Soluzione per sterilizzare i frammenti di radice: acqua ossigenata H_2O_2 30%.
3. Soluzione di blu di bromotimolo (indicatore di pH) 0,4% in soluzione idroalcolica.
4. Soluzione Rosso Congo: 1 g di colorante Rosso Congo in 400 mL di acqua distillata, sterilizzare a +120°C per 20 minuti.
5. Soluzione di microelementi: ($NaMoO_4 \bullet 2H_2O$) 0,235 g, (H_3BO_3) 0,28 g, ($CuSO_4 \bullet 5H_2O$) 0,008 g, ($ZnSO_4 \bullet 7H_2O$) 0,024 g, Acqua distillata 1000 mL.
6. Soluzione di vitamine: biotina (vitamina H) 0,01 g e piridossina (vitamina B6) 0,02 g Acqua distillata 1000 mL, sterilizzare per filtrazione.
7. Mezzo minerale Nfb (Krieg e Döbereiner, 1984): acido malico (DL) 5,0 g, (KOH) 4,0 g, (K_2HPO_4) 0,5 g, ($MgSO_4 \bullet 7H_2O$) 0,2 g, (NaCl) 0,1 g, ($CaCl_2$) 0,02 g, ($FeSO_4 \bullet 7H_2O$) 0,5 g, soluzione di microelementi 2 mL, blu di bromotimolo 4 mL, agar 1,75 g, acqua distillata 1 litro, pH finale 6,8. Sterilizzare a +120 °C per 20 minuti Aggiungere sterilmente 1 mL di soluzione di vitamine.
8. Mezzo minerale al Rosso Congo (Caceres, 1982): acido malico (DL) 5,0 g, (KOH) 4,8 g, (K_2HPO_4) 0,5 g, ($MgSO_4 \bullet 7H_2O$) 0,2 g, (NaCl) 0,1 g, estratto di lievito 0,5 g, ($FeCl_3 \bullet 6H_2O$) 0,015 g, agar 12 g, acqua distillata 985 mL, pH finale 7,0. Sterilizzare a +120°C per 20 minuti dopo di che aggiungere 15 mL di soluzione di Rosso Congo sterile.

3. Procedura consigliata

3.1. Isolamento

1. Ripulire dal suolo l'apparato radicale della pianta campione e lavarlo 3-5 volte con H_2O distillata sterile. Tagliare le radici in frammenti di circa 1 cm di lunghezza. Sterilizzare i frammenti ottenuti mediante immersione per 5 minuti nella soluzione di H_2O_2, lavarli 3 volte con acqua distillata sterile e macerarli con un mortaio ed un pestello sterili.
2. Seminare in tubi da 15 mL, chiusi con tappo d'ovatta e contenenti 5 mL di mezzo minerale Nfb, campioni provenienti dai suddetti trattamenti: 1 g di suolo rizosferico, 1 g (in peso fresco) di radice, 1 g (in peso fresco) di radice sterilizzata superficialmente e macerata, incubare in termostato alla temperatura di +32°C.
3. I batteri appartenenti al genere *Azospirillum*, se presenti, si disporranno nel punto dove la tensione d'ossigeno sarà ottimale per l'azotofissazione e dopo 24-48 h di incubazione si formerà una caratteristica pellicola densa, biancastra, ondulata, 2-4 mm sotto la superficie del mezzo. Inoltre il colore del mezzo minerale virerà da verde a blu.
4. Sottoporre i tubi, nei quali viene riscontrata la formazione della pellicola, al test della riduzione dell'acetilene (Burris, 1974). Sostituire il tappo d'ovatta del tubo con un tappo a tenuta d'aria ed iniettare acetilene (C_2H_2) pari al 12% del volume d'aria del tubo. Dopo 24 h di incubazione misurare la produzione di etilene (C_2H_4) mediante gascromatografo.
5. Prelevare un'ansata di batteri dai tubi che presentano riduzione dell'acetilene e seminarla su piastre Petri contenenti 20 mL di mezzo minerale Rosso Congo. Incubare a +32-35°C per 24-48 h. Su mezzo Rosso Congo i batteri appartenenti al genere *Azospirillum* formano colonie color rosso scarlatto, secche con bordo irregolare, ondulato e superficie rugosa.
6. Prelevare una colonia ben isolata ed inocularla in tubi contenenti mezzo Nfb. Ripetere questi passaggi 3-5 volte fino ad ottenere una coltura pura.

3.2. Quantificazione

Se si desidera quantificare i batteri appartenenti al genere *Azospirillum*, o comunque i microrganismi azotofissatori, presenti in campione, si può abbinare al test della riduzione dell'acetilene la tecnica del numero più probabile (Most Probable Number, MPN).

1. Diluire serialmente in soluzione fisiologica (fino alla diluizione 10^{-8}-10^{-9}) i campioni di suolo (1 g) e/o di radice (1 g).
2. Seminare 1 mL di ciascuna diluizione in tubi da 15 mL contenenti 4 mL di mezzo Nfb (per ciascuna diluizione eseguire 3-5 repliche), incubare in termostato a +32°C per 24 h.
3. Sottoporre i tubi al test della riduzione dell'acetilene.
4. Annotare il numero dei tubi in cui si riscontra crescita e riduzione dell'acetilene. Riferendosi alle tabelle di probabilità di Mc Crady si ottiene una stima del numero di batteri azotofissatori presenti nel campione di partenza (Oberzill, 1967).

3.3. Osservazioni

La rizosfera è un ambiente estremamente ricco di microrganismi di ogni genere ed i mezzi minerali utilizzabili non sono strettamente selettivi per il genere *Azospirillum*. È bene quindi ripetere i passaggi dell'isolamento varie volte, accompagnandoli con osservazioni al microscopio ottico a contrasto di fase.

Il titolo batterico ottenuto mediante la tecnica MPN risulta generalmente più alto di quello reale; inoltre tale tecnica presenta un'alta probabilità di errore alla quale si può ovviare aumentando il numero delle repliche e/o diluizioni.

La caratterizzazione della specie può avvenire basandosi sia su test morfologici e fisiologici secondo i criteri tassonomici descritti da Tarrand et al., (1978) e Krieg e Döbereiner, (1984) sia mediante

l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare quali le analisi di patterns di restrizione, ibridazioni DNA-DNA ed RNA-DNA, e tecniche immunologiche.

4. Bibliografia

Burris R.H. (1974), *Biology of Nitrogen Fixation*. Quispel A. ed. North Holland Publ. Co., Amsterdam, pp. 9-33.

Caceres E.A.R. (1982), *Improved medium for isolation of Azospirillum spp*. Applied and. Environmental Microbiology, 44, 990-991.

Elmerich, C., Zimmer W., Vieille C. (1992), *Associative nitrogen-fixing bacteria.* Biological Nitrogen

Krieg N.R., Döbereiner J. (1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. N.R. Krieg and J.G Holt Eds. The Williams and Wilkins Co Baltimore, pp. 94-104.

Oberzill W. (1967), *Mikrobiologische Analytik*. Hans Carl, Nurnberg, pp. 122-128.

Tarrand J.J., Krieg N.R., Döbereiner J. (1978), *A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group with a description of a new genus, Azospirillum gen. nov. and two species Azospirillum lipoferum (Beijerink) cmb. Nov.and Azospirillum brasilense sp. nov*. Canadian Journal of Microbiology, 24, 967-980.

Metodo III.3

BATTERI IN ASSOCIAZIONE SIMBIOTICA DIAZOTROFA (RIZOBI)

1. Introduzione

I batteri del genere *Rhizobium, Bradyrhizobium, Azorhizobium* e *Sinorhizobium*, bastoncelli gram negativi, comprendono numerose specie e biovar. La loro classificazione, in rapida e continua evoluzione, si è basata per lungo tempo sulle specifiche capacità di instaurare rapporti di associazione simbiotica con specifici generi di piante leguminose, provocando la formazione di speciali strutture conosciute col nome di noduli radicali o tubercoli. In essi i batteri subiscono modificazioni fisiologiche e morfologiche e assumono la capacità di fissare l'azoto atmosferico ad ammoniaca, fertilizzando così direttamente la leguminosa ospite ed ottenendo in cambio composti del carbonio derivanti dalle attività fotosintetiche della pianta stessa. Oggi, i parametri utilizzati per classificare i rizobi non si basano più esclusivamente sulla specificità d'ospite ma anche su un certo numero di caratteristiche fisiologiche, biochimiche e genetiche proprie del microrganismo.

2. Prelievo dei campioni

Il suolo in esame viene idealmente suddiviso in 10-20 parti da ognuna delle quali viene prelevato un campione cilindrico del diametro di circa 3-4 cm e profondo circa cm 10. L'operazione viene naturalmente eseguita impiegando attrezzature e contenitori pre-sterilizzati. Nel caso che altri suoli debbano essere campionati nella stessa seduta verranno utilizzate nuove attrezzature pre-sterilizzate o si procederà ogni volta a lavare le medesime con alcool etilico al 95%, flammando successivamente. L'intervallo di tempo che intercorre tra il campionamento e l'analisi dovrà essere il più breve possibile e laddove i tempi debbano essere forzatamente più prolungati i campioni dovranno essere mantenuti a +4°C.

In laboratorio i 10-20 campioni provenienti da un determinato suolo verranno mescolati a lungo, naturalmente in ambiente pulito e relativamente asettico, fino ad ottenere un campione di suolo il più omogeneo possibile. Le pietre ed i materiali solidi di una certa dimensione possono essere facilmente rimossi per mezzo di un grossolano setaccio, mentre setacci più fini sono da evitare per non eliminare particelle organiche che possono ospitare un gran numero di rizobi. Può essere opportuno determinare l'umidità del terreno per poter poi esprimere i valori in relazione al suo peso secco.

3. Stima del numero di rizobi nel suolo

Ad eccezione di pochissimi casi, peraltro mai totalmente confermati, non si dispone di veri e propri mezzi colturali selettivi per rizobi; ma anche qualora fosse ipotizzabile ottenerne, la possibilità di separare le varie specie di rizobi in coltura è praticamente da escludere. Ne consegue l'opportunità di utilizzare test di nodulazione, in condizioni biologicamente controllate, direttamente sulla pianta.

4. Test di nodulazione

Il metodo consiste essenzialmente nell'inoculare piantine cresciute asetticamente con aliquote provenienti da vari livelli di diluizione del campione di suolo da analizzare. Il numero di rizobi potrà essere calcolato in base al numero di piantine che formeranno noduli ai vari livelli di diluizione. I tests possono essere condotti in tubo, nel caso di piantine di piccole dimensioni, in caso contrario verranno indicate soluzioni alternative.

5. Test in tubo

L'impiego di tubi in vetro (20 x 200 mm), con tappo di cotone o metallico, risponde a varie necessità tra le quali l'ingombro ridotto e la possibilità di essere sterilizzati in autoclave. Il substrato può essere rappresentato da un mezzo agarizzato adatto alla crescita delle piante. In questo caso, tuttavia, l'inoculazione con suolo potrà promuovere la crescita di funghi ed alghe che possono interferire con il processo di nodulazione. L'uso di antimicotici, o ancor meglio di substrati alternativi quali la vermiculite, capace peraltro di sostenere la crescita di alcune specie di leguminose assai meglio del mezzo agarizzato, permetteranno di superare l'ostacolo. In quest'ultimo caso, naturalmente, le piantine dovranno essere irrorate con una soluzione nutritiva adatta e la vermiculite verrà pretrattata al fine di rimuovere eventuali impurezze e limitare l'eventuale reazione alcalina. Possono tuttavia essere utilizzati, specie in sistemi di dimensioni maggiori, altri substrati quali sabbia, agriperlite, argilla espansa etc., da soli od in varie combinazioni.

Questo sistema, adatto come accennato a specie di piccole dimensioni, può tuttavia essere sfruttato anche in alcuni casi relativi a specie di dimensioni maggiori. Esistono infatti dei casi in cui la specie di rizobio investigata è capace di produrre noduli su più di un genere di leguminose, di cui almeno una di dimensioni ridotte. Un esempio su tutti è rappresentato da *Ornithopus sativus*, leguminosa di piccole dimensioni che può essere impiegata al posto di *Lupinus* spp. nella ricerca di *Bradyrhizobium lupini*. La Tab. 1 offre alcune altre analoghe possibilità.

In tutti i casi i semi dovranno essere presterilizzati. La metodologia seguente è consigliata per semi che non presentano particolari problemi:

- immergere rapidamente i semi in alcol etilico al 95%,
- immergere i semi per 5 minuti in una soluzione di $HgCl_2$ allo 0.1%,
- eseguire 10 lavaggi in H_2O distillata e sterile per rimuovere le tracce di $HgCl_2$,
- lasciare i semi ad imbibire nell'ultimo lavaggio per alcune ore,
- deporre i semi sulla superficie di piastre Petri contenenti agar-acqua 1.5%,
- incubare le piastre a temperatura appropriata (generalmente +25°C) al buio e capovolte.

Note:

- alcune specie (es. soia) tendono ad imbibirsi già nella fase di immersione in cloruro mercurico; in questi casi, poiché potrebbero osservarsi malformazioni nella pianta, è consigliato solo un lavaggio in alcool etilico al 95% per 30 secondi,

- alcune specie (es. medica), producendo semi molto duri, tendono a non imbibirsi affatto anche dopo immersione molto prolungata; in questi casi è consigliato l'uso di H_2SO_4 per 5 minuti prima dei consueti lavaggi in acqua,

- alcune specie (es. trifoglio) mostrano di aumentare l'efficienza di germinazione se le piastre vengono mantenute per -48 h a +4°C prima dell'incubazione a +25°C.

Tab. 1 - Leguminose di taglia ridotta che possono essere impiegate come ospite nei test.

Specie di rizobio	Leguminosa ospite	Minime dimensioni dei tubi consigliate (cm)
R. meliloti	*Medicago sativa* L. *M.falcata* L. *M.arabica* (L.) Huds. *M.lupulina* L. *M.minima* (L.) Bart. *M.praecox* DC. *M.rigidula* (L.) All. *Melilotus alba* Desr. *Mel. indica* (L.) All. *Mel.officinalis* (L.) Lam. *Trigonella suavissima* Lindl	15,0 x 1,85
	Medicago littoralis Rhode *M.rugosa* Desr. *M.orbicularis* (L.) Bart. *M.polymorpha* L. *M.scutellata* (L.)Mill. *M.tornata* (L.) Mill. *Trigonella foenum-graecum* L.	15,0 x 2,5
R. leguminosarum bv *trifolii*	*Trifolium alexandrinum* L. *T.hybridum* L. *T.dubium* Sibth. *T.fragiferum* L. *T.glomeratum* L. *T.incarnatum* L. *T.pratense* L. *T.repens* L. *T.resupinatum* L. *T.subterraneum L.*	15,0 x 1,85
R. leguminosarum	*Vicia atropurpurea Desf. V.hirsuta (L.) S.F.Gray V.sativa* L.	15,0 x 2,5
R. leguminosarum bv *phaseoli*	Nessuna disponibile*	--
B. lupini	*Ornithopus sativus* Brot. *O.compressus* L.	15,0 x 1,85
B. japonicum	*Glycine ussuriensis* Regel & Maack	20,0 x 3,0
Bradyrhizobium sp. (gruppo cow-peas)	*Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urb. *M.lathyroides* (L.) Urb. *Teramnus uncinatus* (L.) Sw.	15,0 x 2,5
Rhizobium loti	*Lotus corniculatus* L. *L.hispidus* Desf. *L.pedunculatus* Cav.	15,0 x 1,85
Rhizobium sp. (per *Cicer arietinum L.*)	Nessuna disponibile*	--
Rhizobium sp. [*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit]	*Desmanthus virgatus* (L.) Willdt	15,0 x 2,50

Quando le radichette raggiungono 1-2 cm di lunghezza saranno pronte per essere trasferite asetticamente nei tubi. Questi verranno posti in ambiente adeguato a fornire le adatte condizioni di luminosità (es. 20.000 lux per 16 ore ed 8 ore di buio), temperatura (es. 18/23°C luce/buio) ed umidità (es. 60-80%). Ciò può essere ottenuto in serra, cella climatizzata o fitotrone.
I substrati impiegati per la crescita delle piante, come accennato sopra, potranno essere agarizzati od inerti. In quest'ultimo caso si dovrà provvedere ad irrorare con soluzioni adeguate. Naturalmente tutti i substrati ed i mezzi di coltura utilizzati non dovranno contenere azoto combinato, condizione necessaria a non inibire il processo di nodulazione prima ed eventualmente l'attività nitrogenasica poi. La Tab. 2 mostra alcuni tra i substrati più comunemente impiegati.

Tab. 2 - Soluzioni minerali prive di azoto combinato per la coltivazione di piante leguminose in test di nodulazione.

Composto [a] (mg×L^{-1})	In tubo [b]				Idroponica	In vaso		
	Thorntn	Jensen	Brockwel	Fåhraeus	Munns	McKnigh [c]	Gibson	Bergensen
K_2HPO_4	500	200	500	--	--	--	130	--
Na_2HPO_4	--	--	--	150	--	--	--	--
KH_2HPO_4	--	--	--	100	140	200	--	30
$Ca_3(PO_4)_2$	2000	1000	2000	--	--	--	--	--
$CaHPO_4$	--	--	--	--	--	--	--	--
$CaCO_3$	--	--	100	--	--	--	--	--
$CaCl_2$	--	--	--	100	--	--	6	1
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	--	--	--	--	1088	1500	--	--
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200	200	200	120	230	200	110	30
NaCl	100	200	100	--	--	--	--	--
KCl	--	--	--	--	0.7	300	110	40
$FePO_4$	1000	--	500	--	--	--	--	--
$FeCl_3$	10	140	100	--	3[d]	140	8[d]	3[d]
Fe-citrato	--	--	--	5	--	--	--	--
pH	6,6	6,6	6,6	6,5	6,5	7,0	6,8	6,8

a) viene aggiunto 1 mL×L^{-1} di soluzione di microelementi (2,86 g H_3BO_3, 2,08 g $MnSO_4 \bullet H_2O$, 0,22 g $ZnSO_4 \bullet 7H_2O$, 0,08 g $CuSO_4 \bullet 5H_2O$, 0,11 g $Na_2MoO_4 \bullet 7H_2O$, H_2O fino a 1000 mL)

b) viene aggiunto da 1 a 1,6 % di agar, in relazione al tipo di pianta

c) usato anche per colture in tubo su vermiculite

d) sequestrato con EDTA: 22,8 g EDTA, 250 mL KOH 1N, 10 g $FeCl_3$ (o 17,2 g $FeSO_4 \bullet 7H_2O$) in 1000 mL H_2O; ossigenare intensamente per una notte.

6. Inoculazione delle piante

Il metodo di diluizione dei campioni può variare in relazione al grado di precisione richiesto ed al numero di rizobi che si presume grossolanamente di riscontrare in un determinato suolo. Diluizioni di un fattore 10 vengono impiegate più frequentemente, specie quando non è richiesto un grado di precisione estremamente elevato. Possono tuttavia essere impiegate diluizioni 1:5 e finanche 1:2 per stime più accurate. Qui di seguito verrà esaminata la procedura 1:10.

È necessario disporre di:

- 18 tubi con le piantine, derivate dai semi sterilizzati, non più vecchie di 3-5 giorni,
- contenitori sterili con quantità note di soluzione fisiologica (è da evitare l'acqua per problemi di osmosi con le cellule batteriche) e precisamente: una beuta da 300 mL contenente 90 mL di soluzione e 6 tubi contenenti 9 mL della stessa soluzione,
- pipette sterili da 1 mL.

10 grammi del campione di suolo vengono sospesi in 90 mL di soluzione ed agitati a 200-300 rpm per 10 minuti. Quindi 1 mL di questa sospensione viene trasferito nel primo tubo contenente 9 mL di soluzione fisiologica ed agitato ancora per qualche minuto. Da questo, usando ogni volta una nuova pipetta, tre aliquote da 1 mL ciascuna vengono prelevate ed impiegate per inoculare rispettivamente

tre tubi contenenti le piantine. L'intera operazione viene ripetuta per sei volte, sino ad arrivare al livello di diluizione 10^{-7}. Le piantine vengono quindi lasciate crescere per alcune settimane ed esaminate ad intervalli per la presenza di noduli radicali.
Il numero più probabile di batteri simbionti presenti nel campione di suolo originale verrà calcolato in base al numero di piantine che formeranno noduli ai vari livelli di diluizione, in riferimento alla Tab.3. Essa fornisce stime che vanno da 40 a 10.990.000 organismi per mL di sospensione di suolo originale.
Nel caso si renda necessaria una stima più accurata si potrà procedere ad un test di nodulazione utilizzando serie di diluizione per 5. La procedura di massima rimane la stessa, avendo cura di utilizzare una serie di tubi contenenti non più 9 mL ma 4 mL di soluzione fisiologica. In questo caso le tavole permettono di risalire a valori compresi tra 1 e 252.000 rizobi per mL di sospensione originale (Tab. 4). Se sono previste quantità ancora minori sarà opportuno utilizzare come primo livello di inoculo la sospensione originale stessa (10:90 peso/volume).

Tab. 3 - Numero più probabile (MPN) di batteri capaci di produrre noduli calcolato in base alla distribuzione di campioni positivi (nodulati) in un test di nodulazione basato su serie di diluizione 1:10. Il terreno viene diluito la prima volta 10:90 (peso/volume).

Numero di piantine nodulate (su tre replicati) a seguito di inoculazione con aliquote di 1 mL						Numero più probabile (MPN) di batteri nel campione di origine prima della diluizione per mL	
Livelli di diluizione del campione							
1:10^{-2}	1:10^{-3}	1:10^{-4}	1:10^{-5}	1:10^{-6}	1:10^{-7}	Stima	Limite di confidenza (95%)
1	0	0	0	0	0	0,4 x 10^2	0,1-2,5 x 10^2
2	0	0	0	0	0	0,9 x 10^2	0,2-3,7 x 10^2
2	1	0	0	0	0	1,5 x 10^2	0,4-5,2 x 10^2
3	0	0	0	0	0	2,3 x $l0^2$	0,7-8,0 x 10^2
3	1	0	0	0	0	4,2 x 10^2	L,0-17,2 x 10^2
3	2	0	0	0	0	9,2 x 10^2	2,3-36,7 x 10^2
3	2	1	0	0	0	14,7 x 10^2	4,1-52,1 x 10^2
3	3	0	0	0	0	23,0 x 10^2	6,6-80,3 x 10^2
3	3	1	0	0	0	42,4 x 10^2	10,4-172,5 x 10^2
3	3	2	0	0	0	91,8 x 10^2	22,9-367,2 x 10^2
3	3	2	1	0	0	14,7 x 10^3	4,1-52,1 x 10^3
3	3	3	0	0	0	23,0 x 10^3	6,6-80,4 x 10^3
3	3	3	1	0	0	42,4 x 10^3	l0,4-172,7 x 10^3
3	3	3	2	0	0	91,9 x 10^3	23,0-367,7 x 10^3
3	3	3	2	1	0	14,7 x 10^4	4,1-52,2 x 10^4
3	3	3	3	0	0	23,0 x 10^4	6,6-80,8 x 10^4
3	3	3	3	1	0	42,7 x 10^4	10,4-175,2 x 10^4
3	3	3	3	2	0	93,3 x 10^4	23,2-375,1 x 10^4
3	3	3	3	2	1	14,9 x 10^5	4,2-53,6 x 10^5
3	3	3	3	3	0	24,0 x 10^5	6,7-85,7 x 10^5
3	3	3	3	3	1	46,2 x 10^5	10,4-205,0 x 10^5
3	3	3	3	3	2	109,9 x 10^5	25,7-470,5 x 10^5
3	3	3	3	3	3	>240,0 x 10^5	

Tab. 4 - Numero più probabile (MPN) di batteri capaci di produrre noduli, calcolato in base alla distribuzione di campioni positivi (nodulati) in un test di nodulazione basato su serie di diluizione 1:5. Il terreno viene diluito la prima volta 10:90 (peso/volume).

Numero di piantine nodulate (su 4 replicati) a seguito di inoculazione con aliquote di 1 mL						Numero più probabile (MPN) di batteri nel campione di origine prima della diluizione	
Livelli di diluizione del campione							
1:50	1:250	1:1250	1:6250	1:31250	*1:156250	Stima	Limite di confidenza (95%)
1	0	0	0	0	0	1,1 x 10^1	0,2-7,9 x 10^1
2	0	0	0	0	0	2,6 x 10^1	0,6-10,1 x 10^1
3	0	0	0	0	0	4,6 x 10^1	1,5-14,1 x 10^1
4	0	0	0	0	0	8,0 x 10^1	3,0-21,5 x 10^1
0	1	0	0	0	0	1,0 x 10^1	0,1-7,7 x 10^1
1	1	0	0	0	0	2,3 x 10^1	0,6-9,6 x 10^1
2	1	0	0	0	0	4,0 x 10^1	1,2-12,8 x 10^1
3	1	0	0	0	0	6,5 x 10^1	2,3-18,0 x 10^1
0	2	0	0	0	0	2,1 x 10^1	0,5-9,2 x 10^1
1	2	0	0	0	0	3,5 x 10^1	1,1-11,9 x 10^1
2	2	0	0	0	0	5,5 x 10^1	1,9-16,0 x 10^1
3	2	0	0	0	0	8,7 x 10^1	3,3-23,0 x 10^1
0	3	0	0	0	0	3,0 x 10^1	0,9-10,6 x 10^1
1	3	0	0	0	0	4,9 x 10^1	1,6-14,6 x 10^1
2	3	0	0	0	0	7,2 x 10^1	2,7-19,6 x 10^1
3	3	0	0	0	0	11,3 x 10^1	4,4-29,2 x 10^1
4	1	0	0	0	0	11,4 x 10^1	4,4-29,5 x 10^1
4	2	0	0	0	0	16,2 x 10^1	6,2-42,4 x 10^1
4	3	0	0	0	0	24,2 x 10^1	9,0-64,9 x 10^1
4	4	0	0	0	0	40,4 x 10^1	15,3-106,6 x 10^1
4	0	1	0	0	0	10,8 x 10^1	4,2-28,1 x 10^1
4	1	1	0	0	0	15,1 x 10^1	5,8-39,2 x 10^1
4	2	1	0	0	0	21,5 x 10^1	8,1-57,4 x 10^1
4	3	1	0	0	0	32,8 x 10^1	12,2-87,9 x 10^1
4	0	2	0	0	0	14,1 x 10^1	5,4-36,6 x 10^1
4	1	2	0	0	0	19,6 x 10^1	7,4-51,9 x 10^1
4	2	2	0	0	0	28,3 x 10^1	10,5-76,1 x 10^1
4	3	2	0	0	0	43,6 x 10^1	16,6-114,2 x 10^1
4	0	3	0	0	0	18,1 x 10^1	6,9-47,7 x 10^1
4	1	3	0	0	0	25,2 x 10^1	9,4-67,6 x 10^1
4	2	3	0	0	0	36,4 x 10^1	13,7-96,8 x 10^1
4	3	3	0	0	0	56,5 x 10^1	21,9-146,0 x 10^1
4	4	1	0	0	0	5,7 x 10^2	2,2-14,7 x 10^2
4	4	2	0	0	0	8,1 x 10^2	3,1-21,2 x 10^2
4	4	3	0	0	0	12,1 x 10^2	4,5-32,4 x 10^2
4	4	4	0	0	0	20,2 x 10^2	7,6-53,3 x 10^2
4	4	0	1	0	0	5,4 x 10^2	2,1-14,0 x 10^2
4	4	1	1	0	0	7,5 x 10^2	2,9-19,6 x 10^2
4	4	2	1	0	0	10,8 x 10^2	4,0-28,7 x 10^2
4	4	3	1	0	0	16,4 x 10^2	6,1-43,9 x 10^2
4	4	0	2	0	0	7,1 x 10^2	2,7-18,3 x 10^2
4	4	1	2	0	0	9,8 x 10^2	3,7-26,0 x 10^2
4	4	2	2	0	0	14,1 x 10^2	5,3-38,1 x 10^2
4	4	3	2	0	0	21,8 x 10^2	8,3-57,1 x 10^2
4	4	0	3	0	0	9,1 x 10^2	3,4-23,8 x 10^2
4	4	1	3	0	0	12,6 x 10^2	4,7-33,8 x 10^2
4	4	2	3	0	0	18,2 x 10^2	6,9-48,4 x 10^2
4	4	3	3	0	0	28,2 x 10^2	10,9-73,0 x 10^2
4	4	4	1	0	0	2,9 x 10^3	1,1-7,3 x 10^3

Numero di piantine nodulate (su 4 replicati) a seguito di inoculazione con aliquote di 1 mL						Numero più probabile (MPN) di batteri nel campione di origine prima della diluizione	
Livelli di diluizione del campione							
1:50	1:250	1:1250	1:6250	1:31250	*1:156250	Stima	Limite di confidenza (95%)
4	4	4	2	0	0	4,1 x 10^3	1,6-10,6 x 10^3
4	4	4	3	0	0	6,0 x 10^3	2,3-16,2 x 10^3
4	4	4	4	0	0	10,1 x 10^3	3,8-26,6 x 10^3
4	4	4	0	1	0	2,7 x 10^3	1,0-7,0 x 10^3
4	4	4	1	1	0	3,8 x 10^3	1,5-9,8 x 10^3
4	4	4	2	1	0	5,4 x 10^3	2,0-14,4 x 10^3
4	4	4	3	1	0	8,2 x 10^3	3,1-22,0 x 10^3
4	4	4	0	2	0	3,5 x 10^3	1,4-9,2 x 10^3
4	4	4	1	2	0	4,9 x 10^3	1,8-13,0 x 10^3
4	4	4	2	2	0	7,1 x 10^3	2,6-19,0 x 10^3
4	4	4	3	2	0	10,9 x 10^3	4,2-28,6 x 10^3
4	4	4	0	3	0	4,5 x 10^3	1,7-11,9 x 10^3
4	4	4	1	3	0	6,3 x 10^3	2,3-16,9 x 10^3
4	4	4	2	3	0	9,1 x 10^3	3,4-24,2 x 10^3
4	4	4	3	3	0	14,1 x 10^3	5,4-36,7 x 10^3
4	4	4	4	1	0	14,3 x 10^3	5,5-36,9 x 10^3
4	4	4	4	2	0	20,3 x 10^3	7,8-53,0 x 10^3
4	4	4	4	3	0	30,2 x 10^3	11,2-81,3 x 10^3
4	4	4	4	4	0	50,5 x 10^3	19,0-133,8 x 10^3
4	4	4	4	0	1	13,5 x 10^3	5,2-35,3 x 10^3
4	4	4	4	1	1	18,8 x 10^3	7,2-49,0 x 10^3
4	4	4	4	2	1	26,9 x 10^3	10,1-71,8 x 10^3
4	4	4	4	3	1	41,0 x 10^3	15,3-110,2 x 10^3
4	4	4	4	0	2	17,7 x 10^3	6,8-45,9 x 10^3
4	4	4	4	1	2	24,5 x 10^3	9,2-65,0 x 10^3
4	4	4	4	2	2	35,3 x 10^3	13,1-95,4 x 10^3
4	4	4	4	3	2	54,4 x 10^3	20,6-143,8 x 10^3
4	4	4	4	0	3	22,6 x 10^3	8,6-59,7 x 10^3
4	4	4	4	1	3	31,4 x 10^3	11,7-84,7 x 10^3
4	4	4	4	2	3	45,5 x 10^3	17,0-121,4 x 10^3
4	4	4	4	3	3	70,6 x 10^3	27,1-184,2 x 10^3
4	4	4	4	4	1	7,1 x 10^4	2,7-18,6 x 10^4
4	4	4	4	4	2	10,1 x 10^4	3,8-27,0 x 10^4
4	4	4	4	4	3	15,1 x 10^4	5,4-42,6 x 10^4
4	4	4	4	4	4	25,2 x 10^4	8,6-74,0 x 10^4
4	4	4	4	4	5	>35.5 x10^4	

*da questo livello di diluizione vengono inoculate 5 piantine

7. Considerazioni

La riproducibilità dei risultati che si possono ottenere con la procedura descritta trova ampio riscontro in letteratura.

Quando le piantine vengono fatte crescere in substrato agarizzato, la procedura può essere applicata con efficacia a colture pure del microrganismo, fornendo stime molto simili a quelle ottenibili con la conta diretta. In effetti, l'influenza della rizosfera si estende, in questo tipo di sistema, per tutta l'estensione del substrato, consentendo anche ad una singola cellula di promuovere l'infezione. L'impiego di vermiculite od altri substrati, al contrario, può condurre ad una sottovalutazione del numero di rizobi. Il fattore di correzione, tuttavia, rimane abbastanza costante per un singolo substrato. L'intera procedura potrebbe infine mostrare limiti consistenti di precisione laddove la popolazione di rizobi del suolo fosse estremamente ridotta (< 2/g suolo). In questo caso viene suggerito l'impiego di sistemi più complessi (vasi Leonard) realizzabili con bottiglie in vetro la cui base, accuratamente

rimossa, può servire da supporto e da serbatoio per la porzione superiore, capovolta. Un turacciolo di cotone o di garza servirà da collettore per la soluzione nutritiva. Il sistema, interamente sterilizzabile in autoclave, può far uso di vermiculite come substrato. Nel caso in esame, la vermiculite viene mescolata con quantità crescenti di suolo (p. es. 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 g) e la mistura sarà utilizzata per riempire i contenitori. I semi pregerminati verranno mantenuti isolati dagli altri campioni mediante l'apposizione di un coperchio di piastra Petri, mentre dopo che la piantina sarà abbondantemente emersa si procederà a togliere il coperchio ed a coprire la superficie del substrato con sabbia sterile. Saranno necessarie almeno 10 settimane in cella climatizzata per permettere alla radice di esplorare la maggior parte del substrato. Considerando il rischio reale di contaminazione sarà necessario predisporre adeguati controlli.
Il sistema, sopra descritto sommariamente, viene utilizzato anche nel caso si voglia valutare il numero di rizobi simbionti di piante leguminose di grosse dimensioni che non dispongano di ospiti alternativi di taglia più ridotta (es. *R. leguminosarum* bv *phaseoli*). Le procedure di diluizioni 1:5 o per 1:10 descritte per i test in tubo possono essere adattate anche a questo tipo di sistema. Tuttavia, data la maggiore complessità, il test può essere eseguito con un minor numero di livelli di diluizione e di replicati (p. es. 4 livelli di diluizione in 2 o quattro replicati) potendo comunque fornire stime comprese tra 0,6 e 690 rizobi per mL al più basso livello di diluizione. La preparazione dei semi e dei livelli di diluizione resta invariata rispetto ai test in tubo sebbene l'inoculazione venga iniziata dalla prima sospensione di suolo. Inoltre, le aliquote di 1 mL generalmente impiegate per inoculare le piantine nei test in tubo, vengono diluite fino a 10 mL con la soluzione nutritiva e distribuite su tutta la superficie del vaso. Saranno necessarie almeno 4 settimane di crescita prima di procedere alla valutazione dei noduli radicali ed il numero di rizobi (MPN) per grammo di suolo potrà essere calcolato avvalendosi della Tab. 5.

Tab. 5 - Numero più probabile (MPN) di batteri capaci di produrre noduli, calcolato in base alla distribuzione di campioni positivi (nodulati) in un test di nodulazione in vasi Leonard, basato su serie di diluizione 1:10, in due o quattro replicati.

Numero di piantine nodulate su 4 livelli di diluizione		Numero più probabile (MPN) di batteri per mL al più basso livello di diluizione
due replicati	quattro replicati	
8	16 15	>700
7	14 13	690 340
6	12 11	180 100
5	10 9	59 31
4	8 7	17 10
3	6 5	5,8 3,1
2	4 3	1,7 1,0
1	2	0,58
0	1,0	<0,5

8. Conta diretta
La conta diretta dei rizobi nel suolo può essere eseguita quando il loro numero è simile o superiore a quello degli altri microrganismi presenti. Tale situazione può verificarsi ad esempio nel caso in cui sia stata seminata una leguminosa i cui semi siano stati adeguatamente batterizzati.

9. Conta in piastra
La procedura è simile a quella descritta in altro paragrafo per microrganismi di altra natura. Dai livelli di diluizione più vicini al numero di rizobi previsto vengono prelevate aliquote di 1 mL della sospensione che saranno direttamente mescolate con 14 mL di mezzo colturale agarizzato, ma ancora allo stato fluido. Il substrato generalmente usato è YMA (Yeast Mannitol Agar) che ha la seguente composizione: K_2HPO_4 0,5 g×L^{-1}, $MgSO_4$•$7H_2O$ 0,2 g×L^{-1}, NaCl 0,1 g×L^{-1}, mannitolo 10,0 g×L^{-1}, estratto di lievito 0,4 g×L^{-1}, pH 6,8. Si suggerisce l'aggiunta di un antimicotico (es. cicloesimide 50 µg×mL^{-1}) per limitare la crescita di miceti e Rosso-Congo (1 mL×L^{-1}di una soluzione 0,25% peso/volume) che consente di distinguere i rizobi, che non assorbono il colorante, dalla maggior parte di microrganismi comuni, capaci di assorbirlo.
Le piastre Petri così predisposte verranno incubate a +28°C per 4 giorni nel caso di rizobi a rapida crescita, e fino a 10-14 giorni nel caso di rizobi a lenta crescita.
Questa procedura può venir adottata per la valutazione di inoculanti commerciali allestiti su supporti sterili, facendo uso anche di terreni colturali che consentano la crescita, e quindi la valutazione, di microflora contaminante.

10. Identificazione dei ceppi
Tutte le procedure sopra descritte permettono di identificare la specie di rizobio in base alla capacità di infettare lo specifico ospite. Ma nell'ambiente suolo sono spesso presenti vari ceppi della stessa specie di rizobio ed è spesso importante poter distinguere i ceppi indigeni da quelli di nuova introduzione. Questi ultimi, anche in relazione alle recenti normative in materia dovranno perciò possedere caratteristiche tali da renderli identificabili. Potrà così essere possibile comprendere la dinamica della popolazione nel tempo e disporre così di un adeguato sistema di monitoraggio per valutarne l'impatto ambientale. Ciò si rende particolarmente necessario per microrganismi geneticamente modificati, anche se troppo spesso si tende a considerare questi ultimi gli unici a possedere potenzialità negative rilevanti dal punto di vista ambientale.
Geneticamente modificati o meno, i ceppi di nuova introduzione dovrebbero possedere opportuni markers che ne permettano l'identificazione nel suolo in cui sono stati introdotti.

Alcuni dei markers utilizzati si riconducono alle proprietà originarie dei vari ceppi e vengono evidenziati mediante i seguenti test:
- capacità di indurre formazione di noduli sullo specifico ospite,
- attività nitrogenasica,
- attività idrogenasica,
- attività nitrato- e nitrito-riduttasica,
- altre attività enzimatiche,
- profilo proteico,
- profilo lipopolisaccaridico,
- tipizzazione fagica,
- resistenza intrinseca ad antibiotici.

Ulteriori tests prevedono l'analisi del genoma tramite:
- Profilo plasmidico,
- CHEF (contour-clamped homogeneous electric field),

- ARDRA (Amplified-Ribosomal DNA Restriction Analysis),
- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Ulteriori markers possono venire introdotti nelle cellule batteriche mediante manipolazione genetica:
- fattori di resistenza o attività enzimatiche particolari (es. geni lac per la ß-galattosidasi, geni luc o lux per la luciferasi) tramite inserimento di: plasmidi, transposoni, cassette geniche.

Altri markers possono essere allestiti mediante l'ottenimento di anticorpi poli o monoclonali e rilevati mediante le seguenti procedure:
- immunoprecipitazione,
- immunodiffusione,
- immunofluorescenza,
- ELISA (Enzyme Linked Immunoadsorbent Assay).

Metodo III.4

ATTINOMICETI AZOTOFISSATORI DEL GENERE *FRANKIA*

1. Introduzione
Gli attinomiceti del genere *Frankia* (*Actinomycetales*) sono batteri Gram positivi filamentosi. Essi sono facilmente identificabili, a livello di genere, sulla base della peculiare morfologia [microife ramificate e settate (0,5-2 µm), sporangi multiloculari (10-100 µm), diazovescicole (3-5 µm)], della crescita estremamente lenta (tempo di duplicazione fino a cinque giorni), della capacità di infettare le piante ospiti e di fissare azoto molecolare sia in coltura pura che in simbiosi (Lechevalier e Lechevalier, 1989).
A differenza dei rizobi, che sono stati coltivati in vitro fin dalla fine del secolo scorso, il primo ceppo di *Frankia* è stato isolato da noduli radicali soltanto nel 1978 (Callaham et al., 1978). L'assenza di un mezzo di coltura selettivo per questi attinomiceti ne rende, a tutt'oggi, molto difficile l'isolamento diretto dal suolo. I noduli che *Frankia* induce sulle radici delle piante ospiti rappresentano l'unica forma di accertamento della presenza di questi attinomiceti in un suolo. In base alle conoscenze attuali, poiché la distribuzione dei ceppi di *Frankia* nei suoli non appare strettamente legata a quella delle piante attinorriziche, la presenza di *Frankia* spp. in un dato suolo non assumerebbe alcun particolare significato ecologico in sé. Al contrario, l'assenza di questi attinomiceti in un suolo indicherebbe che esso è molto giovane oppure che è stato disturbato da attività antropiche o da catastrofi naturali. La ricerca e la conta di *Frankia* spp. nel suolo acquistano notevole importanza, quindi, nelle applicazioni selvicolturali e nel recupero ambientale, paesaggistico e produttivo di suoli degradati.

2. Metodi per evidenziare *Frankia* spp. nel suolo

2.1. Campionamento
Vengono utilizzate metodologie standard per il prelievo asettico dei campioni, utilizzando strumenti sterili e conservando i campioni in contenitori sterili, per non più di 20 giorni, a +4°C. Per tempi maggiori si consiglia la conservazione a -80°C. Per analisi di routine si prelevano 3-10 campioni superficiali di 1 dm^3, escludendo la lettiera e le piante, che vengono vagliati a 5 e 2 mm, riuniti, omogeneizzati lungamente in asepsi e frazionati.

3. Metodo qualitativo: DPBA (Direct Plant BioAssay)
(Rodriguez-Barrueco, 1968)

3.1. Premessa
A causa della mancanza di un mezzo selettivo per la coltura in vitro di *Frankia* spp. e della non rispondenza delle tecniche immunologiche, non è possibile usare le tecniche di ricerca tradizionali. Benché notevoli progressi si stiano facendo per la messa a punto di metodi diretti per la ricerca di *Frankia* nel suolo l'unico metodo attualmente utilizzabile di routine è di tipo indiretto, basato cioè sulla suscettibilità delle piante ospiti ad essere infettate da *Frankia* spp. (trappole biologiche). I noduli indotti sulle radici delle piante ospiti rappresentano, infatti, l'unico sintomo diagnostico della presenza di questi microrganismi in un suolo.

3.2. Materiali ed apparecchiature

Cella fitoclimatica; cappa a flusso laminare; microscopio ottico; semi di piante attinorriziche a germinabilità certificata; vasi di polietilene resistenti all'autoclave, con sottovaso; piastre sterili; beuta da 500 mL sterile, ancoretta magnetica; colino da tè in metallo; pinzetta metallica; lametta da barba.

3.3. Reagenti

H_2O_2 30%; agaragar; H_2O distillata sterile; alcool denaturato; soluzione di blu cotone 0,25% in acido lattico al 50%.

3.4. Procedura consigliata

1. Disinfezione dei semi: porre i semi nella beuta da 500 mL, aggiungere 100 mL di H_2O_2 30%, agitare 20 minuti, lavare 5 volte per 10 minuti con 200 mL di H_2O distillata sterile. Sgocciolare con il colino sterile in cappa a flusso laminare e conservare fino all'uso in scatola Petri a +4°C.
2. Germinazione in asepsi: in cappa a flusso laminare, trasferire i semi ad uno ad uno in piastre contenenti acqua agarizzata allo 0,7%, pH 7, usando la pinzetta disinfettata in alcool e flambata ad ogni passaggio, avendo cura di distanziarli di almeno 2 cm. Incubare in cella fitoclimatica per 3-30 giorni (a seconda della specie). Osservare ogni giorno le piastre al microscopio ottico ed eliminare le plantule eventualmente contaminate (in cappa a flusso laminare).
3. All'emissione della prima foglia vera, trapiantare le plantule sane, in cappa a flusso laminare, nei vasi sterilizzati e riempiti di suolo vagliato e inumidito con H_2O distillata sterile.
4. Incubare in cella fitoclimatica per 3-6 mesi (a seconda della specie), riempiendo il sottovaso di H_2O distillata sterile ogni settimana. Intercalare i vasi con il suolo con file di vasi di controllo contenenti lo stesso suolo sterilizzato o un substrato inerte sterile.
5. Rilevare la presenza dei noduli estraendo delicatamente gli apparati radicali dal suolo, previa immersione dell'intero vaso in acqua saponata tiepida per 10 minuti.
6. Confermare la presenza di *Frankia* spp. nei noduli mediante osservazione al microscopio ottico di sezioni longitudinali a fresco, colorate con blu cotone. I lobi vengono facilmente sezionati a mano con una lametta da barba.

3.5. Osservazioni

I noduli indotti da *Frankia* spp. sulle radici delle piante ospiti sono generalmente di tipo "coralloide", costituiti da numerosi lobi ramificati, e sono visibili ad occhio nudo. L'uso dello stereomicroscopio può, tuttavia, aiutare a discriminare i noduli giovani dalle "ginocchiature" delle radici. Questo metodo fornisce informazioni sulla presenza di una popolazione indigena di *Frankia* capace di infettare le specie ospiti utilizzate. La sensibilità, è subordinata all'uso di materiale vegetale di specie e provenienze le più diversificate possibili, perché ciascun genotipo vegetale può selezionare, e quindi rivelare, solo il microsimbionte più adatto alle sue esigenze. È sconsigliato per la ricerca quantitativa in quanto il volume di suolo esplorato dalle radici è difficilmente standardizzabile, perché i siti di infezione possono risultare limitanti e perché le caratteristiche del suolo possono non essere ideali per la pianta usata (pH, pO_2, $CaCO_3$, etc.). Nel caso di suoli acidi, infatti, è necessario allestire prove parallele con lo stesso suolo portato alla neutralità mediante aggiunte opportune di $CaCO_3$ sterile.

4. Metodo Quantitativo: Metodo MPN-PBA (Most Probable Number - Plant BioAssay) (Smolander et al., 1988; Toomsan et al., 1984).

4.1. Premessa

I numerosi metodi descritti in letteratura possono essere ricondotti a due tipi principali, da scegliere volta per volta in base all'accuratezza necessaria, le dimensioni del campione, il tempo a disposizione e lo scopo. I due metodi qui descritti, basati sull'inoculazione di piante ospiti (Plant Bio-Assay) con sospensioni-diluizioni di suolo, seguita dal conteggio delle piante nodulate o dal numero dei noduli

formati per unità di suolo, hanno in comune la caratteristica di essere indipendenti sia dai parametri chimico-fisici del suolo da esaminare, che dal numero dei "siti infettivi" presenti sulle radici delle piante trappola.

4.2. Materiali ed apparecchiature
Cella fitoclimatica; cappa a flusso laminare; microscopio ottico; semi di piante attinorriziche a germinabilità certificata; piastre sterili; beute sterili: 1 da 5 L, 1 da 2 L, 1 da 1L per ogni diluizione; vagli da 1 e 2 mm; 5 bottiglie da 100 mL sterili per ogni diluizione; 5 flaconi da 500 mL sterili per ogni diluizione; lametta da barba.

4.3. Reagenti
H_2O distillata e sterile; agaragar; Soluzione Nutritiva di Hoagland e Arnon (1950) modificata, preparata sciogliendo in 1 L di H_2O distillata i seguenti sali (quantità espresse in grammi) e sterilizzata in autoclave:

K_2SO_4	0,30	$MgSO_4•7H_2O$	0,50
KH_2PO_4	0,02	K_2HPO_4	0,20
$CaSO_4•2H_2O$	0,08	$CaCl_2•2H_2O$	0,50
$CaSO_4•2H_2O$	0,01	Oligoelementi	1,00*
$FeCl_3$ $6H_2O$		pH 6,5-6,8	

*Preparare la soluzione di oligoelementi disciogliendo 2 g L^{-1} di H_3BO_3; 0,8 g L^{-1} di $ZnSO_4•7H_2O$; 0,6 g L^{-1} di $MnCl_2•4H_2O$; 0,2 g L^{-1} di $CuSO_4•7H_2O$; 0,03 g L^{-1} di Na_2MoO_4; 0,01 g L^{-1} di $CoCl_2•6H_2O$.

Soluzione di blu cotone 0,25% in acido lattico al 50%.

4.4. Procedura consigliata
1. Circa due mesi prima dell'analisi, far germinare 50-100 semi della/e specie ospite/i prescelta/e, come descritto nel metodo DPBA (punti 1, 2).
2. All'emissione della prima foglia vera, trasferire le plantule sane, in cappa a flusso laminare, in bottiglie da 100 mL oscurate con alluminio e contenenti la soluzione nutritiva sterile diluita al 50% con H_2O sterile e addizionata di $NaNO_3$ 0,25 mM, immobilizzandole sul setto del tappo (2 per ogni bottiglia).
3. Incubare in cella fitoclimatica per 6 settimane, rinnovando completamente la soluzione nutritiva addizionata di ammonio ogni due settimane. 15 giorni prima dell'inoculo, utilizzare la soluzione nutritiva preparata senza azoto.
4. In condizioni di asepsi, porre 200 mL di suolo vagliato e omogeneizzato in una beuta da 5L sterile, portare a 2 L con soluzione nutritiva sterile, agitare 5 volte per 1 minuto, a mano.
5. Prelevare 400 mL della sospensione e filtrarla successivamente con i due vagli da 2 e 1 mm, recuperando nella beuta da 2 L.
6. Lavare i due vagli con 400 mL della soluzione nutritiva sterile, riunendo con la precedente.
7. Diluire serialmente per 5 volte di un fattore 10, usando le beute sterili da 1 L.
8. Frazionare ogni diluizione in 5 bottiglie sterili da 100 mL, agitare bene ogni bottiglia e introdurvi le radici di 2 piantine di 2 mesi, immobilizzate dal setto del tappo (5-10 piantine per diluizione).
9. Incubare per 6 giorni agitando lungamente ogni bottiglia ogni giorno.
10. Al settimo giorno trasferire i tappi dei flaconi, con le piantine immobilizzate, sui flaconi da 500 mL, contenenti soluzione nutritiva sterile senza azoto.
11. Incubare per 6 settimane cambiando completamente la soluzione ogni due settimane.

12. Rilevare i dati come Positivo (almeno 1 nodulo) o Negativo (nessun nodulo) e risalire al numero di Unità Nodulanti per cm^3 di suolo, usando le tabelle del metodo MPN.
13. Confermare la presenza di *Frankia* nei noduli mediante osservazione al microscopio ottico di sezioni longitudinali a fresco, colorate con blu cotone.

4.5. Osservazioni

La coltura delle piante in mezzo liquido permette una rapida identificazione dei noduli senza disturbare le piante, ma non è adatta a tutte le specie. Per le piante xerofile, modificare i punti 2 e 3 trasferendo le plantule in vasetti sterilizzati contenenti sabbia grossolana o argilla espansa, imbibite di soluzione nutritiva. Irrigare ogni settimana con soluzione nutritiva diluita al 50% in H_2O sterile; 15 giorni prima dell'inoculo sostituire la soluzione nutritiva con H_2O sterile. L'inoculazione delle piantine di 2 mesi viene fatta, immediatamente dopo la diluizione del campione, vicino al colletto, con 5 mL di sospensione per piantina. Il tempo di incubazione è, in questo caso, di almeno 3 mesi.

5. Metodo Quantitativo NC-PBA (Nodule Counting - Plant BioAssay) (Smolander e Sundman, 1987; Van Dijk, 1979; Van Dijk, 1984)

5.1. Materiali ed apparecchiature

Cella fitoclimatica; cappa a flusso laminare; microscopio ottico; semi di piante attinorriziche a germinabilità certificata; piastre sterili; beute sterili: 1 da 5 L, 1 da 2 L, 1 da 1 L per ogni diluizione; vagli da 1 e 2 mm; 30-40 vasetti da 500 mL in polietilene autoclavabile, per ogni diluizione; lametta da barba.

5.2. Reagenti

Come nel metodo MPN-PBA.

5.3. Procedura consigliata

1. Circa due mesi prima dell'analisi, far germinare 200 semi della/e specie ospite/i prescelta/e, come descritto nel metodo DPBA (punti 1, 2).
2. All'emissione della prima foglia vera, trasferire le plantule sane, in cappa a flusso laminare, in vasetti sterilizzati contenenti sabbia grossolana o argilla espansa imbibite di soluzione nutritiva.
3. Incubare in cella fitoclimatica per 6 settimane, irrigando ogni settimana con soluzione nutritiva diluita al 50% in H_2O sterile; 15 giorni prima dell'inoculo, sostituire la soluzione nutritiva con H_2O sterile.
4. Preparare le sospensioni-diluizioni di suolo come descritto ai punti 4-7 del metodo MPN-PBA.
5. Per ogni diluizione inoculare 30-40 piantine di 2 mesi, ciascuna con 5 mL di sospensione, vicino al colletto.
6. Incubare per 3-6 mesi, irrigando ogni settimana con soluzione nutritiva priva di azoto.
7. Contare i noduli indotti sulle radici di ogni piantina e risalire al numero di NU per cm^3 di suolo sulla base dei dati che mostrano una relazione più o meno lineare tra la quantità di inoculo e il livello di nodulazione (Van Dijk, 1984).
8. Confermare la presenza di *Frankia* nei noduli mediante osservazione al microscopio ottico di sezioni longitudinali a fresco, colorate con blu cotone.

5.4. Osservazioni

Le diluizioni seriali possono anche essere eseguite in mezzo solido, usando sabbia grossolana sterile in proporzioni crescenti e omogeneizzando a lungo la miscela in condizioni asettiche. In questo caso le plantule di cui al punto 2 sono trapiantate direttamente in vasi sterili riempiti con le diluizioni "solide" e irrigate con soluzione nutritiva sterile diluita.

6. Isolamento di *Frankia* spp. dal suolo
Gli unici metodi utilizzabili di routine sono di tipo indiretto e consistono in una fase di arricchimento mediante piante ospiti usate come "trappole biologiche", seguita da una fase di isolamento vera e propria, a partire dai noduli radicali ottenuti su tali piante. L'unico metodo diretto, descritto da Baker e O'Keefe nel 1984, non è mai entrato nella routine dei laboratori interessati, che hanno generalmente adottato i metodi indiretti. Qui di seguito vengono riportati entrambi i tipi di metodi. Comunque, in base ad un accordo tra i ricercatori del settore e in attesa di definire criteri affidabili per la definizione delle specie, tutti i ceppi di *Frankia* isolati in coltura pura vengono indicati come *Frankia* spp., dando a ciascuno un numero di riconoscimento formato da tre lettere (che indicano il laboratorio ed il Paese) seguito da un massimo di 10 cifre, le prime quattro delle quali codificano il genere e la specie della pianta ospite dalla quale il ceppo è stato isolato o indicano l'isolamento diretto da suolo.

7. Metodo Diretto (Baker e O'Keefe, 1984)
Si basa sulla differenza di densità tra le cellule di *Frankia*, le particelle di suolo, i tessuti vegetali e gli altri microrganismi, che possono quindi venire separate e concentrate per mezzo di un gradiente discontinuo di saccarosio.

7.1. Materiali ed apparecchiature
Ultracentrifuga con rotore basculante: tubi da ultracentrifuga (100 mL) trasparenti e di materiale perforabile (tipo Beckman Ultra-clear, Quick Seal); rifrattometro; piastre sterili.

7.2. Reagenti
Soluzione di fenolo allo 0,7% sterile, 30 mL; soluzioni di saccarosio 2,5 M; 1,6 M; 1,0 M; 50 mL. L'accuratezza delle concentrazioni è importante e deve essere verificata misurandone l'indice di rifrazione a +20°C (rispettivamente 1,442; 1,410; 1,381).

7.3. Terreno di coltura minimale BAP di Murry et al., (1984) in g L^{-1}

$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	0,02	Na Propionato	0,81
$CaCl_2 \bullet 2H_2O$	0,01	Fe Citrato	1,00**
Oligoelementi	1,00*	pH 6,8	

(*) mL della seguente soluzione (g L^{-1}):
H_3BO_3 1,5; $ZnSO_4 \bullet 7H_2O$ 0,6; $CuSO_4 \bullet 7H_2O$ 0,1; $MnCl_2 \bullet 4H_2O$ 0,57; Na_2MoO_4 0,0333; $CoCl_2 \bullet 6H_2O$ 0,083.

(**)mL della seguente soluzione (g L^{-1}):
$FeNH_4$ Citrato 10; Acido Citrico 10.

7.4. Procedura consigliata
1. Allestire il gradiente discontinuo versando, in successione, lungo la parete di un tubo da ultracentrifuga da 100 mL trasparente e perforabile: 30 mL di soluzione di saccarosio 2,5 M, 30 mL di soluzione 1,6 M e 20 mL di soluzione 1 M.
2. Deporre 5 g di suolo in una beuta da 50 mL, aggiungere 25 mL di soluzione di fenolo e incubare in agitazione per 30 minuti.
3. Trasferire la sospensione di suolo sulla superficie del gradiente e centrifugare fino all'equilibrio (100.000 g per 3 h). Gli autori fanno presente che l'equilibrio può essere raggiunto anche con una centrifuga da banco in un'ora a 600 giri.
4. Recuperare in una provetta sterile le cellule di *Frankia* (concentrate all'interfaccia tra le fasi 2,5 M e 1,6 M) forando il fondo del tubo con un ago sterile e lasciando uscire per gravità.

5. Diluire serialmente per 5 volte con fattore 10 e seminare le sospensioni in profondità, in 10 piastre per diluizione, su terreno minimale agarizzato.
6. Incubare a +28°C per 3-6 settimane, eliminando giornalmente le piastre visibilmente contaminate da funghi e batteri; le colonie di *Frankia* si possono distinguere microscopicamente da quelle degli altri attinomiceti in quanto si sviluppano molto lentamente a partire dai mazzetti di ife e diazovescicole presenti originariamente nei tessuti del nodulo.
7. Quando le colonie di *Frankia* sono visibili ad occhio nudo (20-30 giorni), trasferirle individualmente in terreno liquido, confermando l'isolamento con osservazione microscopica.

7.5. Osservazioni
Il metodo originale risulta eccessivamente complicato e, richiedendo un'ultracentrifuga refrigerata, non è utilizzabile da tutti i laboratori. L'equilibrio di separazione delle cellule di *Frankia* si può raggiungere in meno di un'ora anche con una centrifuga da banco con rotore basculante; la separazione delle fasi può, inoltre, essere evidenziata mediante colorazione delle tre soluzioni di saccarosio con coloranti da pasticceria (1 goccia).
L'addizione di fenolo alla sospensione di suolo riduce la popolazione batterica contaminante senza inibire *Frankia* spp., per incubazioni brevi.

8. Metodi indiretti
I quattro metodi qui descritti sono risultati adatti all'uso routinario: microdissezione (Lalonde e Calvert, 1979), filtrazione differenziale (Benson, 1982), diluizioni seriali (Diem et al., 1982) e frazionamento in gradiente di saccarosio (Baker e O'Keefe, 1984). La scelta dell'uno o dell'altro è a discrezione del ricercatore o sull'equipaggiamento del laboratorio. In tutti i casi i noduli radicali indotti sulle piante trappola devono essere prelevati e manipolati in condizioni di asetticità, separando i singoli lobi e asportando completamente le particelle di suolo aderite alla superficie esterna, per mezzo di ripetuti lavaggi in soluzioni detergenti. La conservazione dei campioni prima dell'isolamento, può avvenire a +4°C per pochi giorni, o a -20°C. Poiché le piante vengono inoculate con sospensioni di suolo, esse sono verosimilmente venute a contatto con l'intera microflora: di fondamentale importanza risultano, quindi, le pratiche di disinfezione superficiale dei noduli.

9. Microdissezione (Lalonde e Calvert, 1979)
È probabilmente il metodo più usato: si basa sull'incubazione dei tessuti infettati del nodulo in un terreno ricco, che favorisce la crescita delle microife di *Frankia* fuori dai tessuti vegetali.

9.1. Materiali ed apparecchiature
Cappa aspirante, cappa a flusso laminare, piastre sterili, provette con tappo di cotone, bisturi con manico metallico, pinzetta metallica, termostato.

9.2. Reagenti
Soluzione di OsO_4 all'1% in H_2O: in cappa aspirante, porre una fiala da 250 mg in una bottiglia da 100 mL, rompere il vetro della fiala con una bacchetta di vetro, aggiungere 25 mL di H_2O distillata, tappare e agitare fino a completa dissoluzione. Attenzione, l'OsO_4 è estremamente tossico, manipolare sempre con i guanti e sotto cappa aspirante.

9.3. Terreno di isolamento Qmod in g L^{-1}

K_2HPO_4	0,30	NaH_2PO_4	0,20
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	0,20	KCl	0,20
Estratto di Lievito	0,50	Peptone	5,00
Glucosio	10,00	Fe Citrato	1,00**

Oligoelementi	1,00*	$CaCO_3$	0,10
Lecitina di soia	0,05	Tween 80	2,00

pH 6,8
(*) mL della seguente soluzione (g L^{-1}):
H_3BO_3 1,5; $ZnSO_4$ $7H_2O$ 0,6; $CuSO_4$•$7H_2O$ 0,1; $MnCl_2$•$4H_2O$ 0,57; Na_2MoO_4 0,0333; $CoCl_2$•$6H_2O$ 0,083.

(**) mL della seguente soluzione (g L^{-1}):
$FeNH_4$ Citrato 10; Acido Citrico 10.

9.4. Procedura consigliata

1. In cappa aspirante, sterilizzare la superficie esterna e gli strati superficiali del lobo mediante immersione per 30-60 secondi nella soluzione di acido osmico; recuperare la soluzione usata e lavare abbondantemente con acqua sterile.
2. In cappa a flusso laminare, tagliare il lobo in pezzettini o fettine con bisturi sterile, sul fondo di una piastra sterile.
3. Trasferire ciascun frammento in una provetta di terreno liquido (o includere nella massa di terreno solido, in piastra). Allestire 30-50 ripetizioni in quanto un'elevata percentuale di tubi risulta normalmente contaminata da microrganismi estranei non uccisi.
4. Incubare per 3-6 settimane a +28°C, eliminando tempestivamente i tubi contaminati (un'estesa crescita dopo qualche giorno di incubazione è sintomo di contaminazione).
5. *Frankia* sp. forma colonie fioccose chiare sul fondo della provetta; confermare sempre l'isolamento, mediante esame microscopico a fresco, in contrasto di fase: la presenza di sporangi multiloculari è l'unico carattere morfologico diagnostico per questo genere di attinomiceti.

Note:

L'impiego di OsO_4 è estremamente pericoloso, ma l'effetto sterilizzante risulta abbastanza riproducibile. Il fatto che le cellule di *Frankia* restino lungamente in contatto con i composti fenolici (batteriostatici) presenti nella maggior parte dei noduli, sembra alla base di molti insuccessi. Risulta piuttosto difficile discriminare *Frankia* dagli altri attinomiceti, nelle prime fasi di sviluppo delle colonie in provetta: sono quindi indispensabili molti controlli di purezza nella fase di moltiplicazione delle colture.

10. Filtrazione Differenziale (Benson, 1982)
Si basa sulla separazione precoce delle cellule di *Frankia* dai tessuti nodulari, mediante filtrazione differenziale e sulla loro incubazione in terreno complesso.

10.1. Materiali ed apparecchiature
Mortaio e pestello (oppure Potter) sterili; piastre sterili; provette sterili contenenti 9 mL di terreno FM; pipette Pasteur sterili; termostato; cappa a flusso laminare.
Dispositivo di filtrazione differenziale descritto dall'Autore (Benson, 1982) sostituibile da due apparati di filtrazione dotati di membrane con pori di 50 µm e 20 µm, rispettivamente, sterilizzabili in autoclave.

10.2. Reagenti
H_2O distillata sterile; NaClO 1%; terreno di isolamento FM in g L^{-1}

K_2HPO_4	3,00	KH_2PO_4	2,00
NaCl	0,30	$MgSO_4$•$7H_2O$	0,20
Na Piruvato	3,00	Casaminoacidi	3,00

Oligoelementi	1,00*	Fe EDTA	0,20**
Vitamine	1,00***	pH 6,9	

(*) mL della seguente soluzione (g L^{-1}):
H_3BO_3 1,5; $ZnSO_4 \bullet 7H_2O$ 0,6; $CuSO_4 \bullet 7H_2O$ 0,1; $MnCl_2 \bullet 4H_2O$ 0,57; Na_2MoO_4 0,0333; $CoCl_2 \bullet 6H_2O$ 0,083.

(**) mL della seguente soluzione (g L^{-1}):
Na_2 EDTA 29,8; $FeSO_4 \bullet 7H_2O$ 24,9.

(***) mL della seguente soluzione (g L^{-1}):
Tiamina Cloridrato 0,1; Piridossina Solfato 0,5; Acido nicotinico 0,5.

10.3. Procedura consigliata
1. In cappa a flusso laminare: disinfettare 4-15 lobi per ogni nodulo con la soluzione di ipoclorito per 5 minuti agitando.
2. Lavare 5 volte con abbondante H_2O distillata sterile e trasferire in mortaio.
3. Omogeneizzare in 5 mL di terreno FM liquido.
4. Trasferire la sospensione nell'apparato di filtrazione da 50 µm, lasciando filtrare per gravità.
5. Lavare con 30 mL di terreno FM e trasferire il filtrato nell'apparato di filtrazione da 20 µm, lasciando filtrare per gravità.
6. Lavare i mazzetti di vescicole per 2 volte con 30 mL di terreno FM.
7. Trasferire i mazzetti di ife in una provetta sterile mediante una pipetta Pasteur sterile.
8. Diluire serialmente e seminare in piastra (in profondità) in terreno FM agarizzato.
9. Incubare a +28°C per 2-4 settimane, controllando microscopicamente lo sviluppo di micelio a partire dai mazzetti di ife.
10. Quando le colonie sono visibili ad occhio nudo (20-30 giorni), trasferirle individualmente in terreno liquido, confermando l'isolamento con osservazione microscopica.

10.4. Osservazioni
Escludendo la maggior parte dei microrganismi contaminanti e dei composti inibitori, questo metodo è risultato efficace nel 91% dei casi. L'asportazione di tutti i composti di origine vegetale, però, sfavorisce l'isolamento dei ceppi di *Frankia* che richiedono fattori di crescita sconosciuti.

11. Diluizioni Seriali (Diem et al., 1982; Margheri et al., 1984)
È il metodo classico della batteriologia, adattato all'isolamento di *Frankia* spp. dopo arricchimento nei tessuti nodulari. Si basa sulla separazione fisica di *Frankia* sp. dai frammenti vegetali e da eventuali contaminanti mediante diluizione e semina in terreno solido. Il contatto con i composti inibenti (polifenoli) viene ridotto per diluizione, senza escludere totalmente dal terreno eventuali fattori di crescita presenti nei tessuti vegetali.

11.1. Materiali ed apparecchiature
Omogeneizzatori di tessuti (Potter o mortaio) di vetro sterilizzati; piastre sterili; provette sterili contenenti 9 mL di terreno liquido; pipette di vetro da 1 mL, a bocca larga (diametro 3-4 mm) sterili; termostato; cappa a flusso laminare.

11.2. Reagenti
H_2O distillata sterile; H_2O_2 30%;

11.3. Terreno di isolamento Tween 80/NH4+(Blom et al., 1980) in g L^{-1}

KH_2PO_4	0,30	Na_2HPO_4	0,20
$MgSO_4{\bullet}7H_2O$	0,20	NH_4Cl	0,02
$CaCl_2\ 2H_2O$	0,02	Tween 80	2,00
Oligoelementi	1,00*	Fe EDTA	1,00**
Vitamine	1,00 °	pH 7,0	

(*) mL della seguente soluzione (gL^{-1}):
H_3BO_3 1,5; $ZnSO_4{\bullet}7H_2O$ 0,6; $CuSO_4{\bullet}7H_2O$ 0,1; $MnCl_2{\bullet}4H_2O$ 0,57; Na_2MoO_4 0,0333; $CoCl_2{\bullet}6H_2O$ 0,083.

(**) mL della seguente soluzione (gL^{-1}):
Na_2 EDTA 29,8; $FeSO_4{\bullet}7H_2O$ 24,9.

(°) mL della seguente soluzione (gL^{-1}):
Tiamina Cloridrato 0,1; Piridossina Solfato 0,5; Acido nicotinico 0,5.

11.4. Procedura consigliata
1. Disinfettare i lobi per 15 minuti in H_2O_2 al 30%.
2. Lavare 10 volte in acqua distillata sterile, e trasferire singolarmente in Potter.
3. Omogeneizzare delicatamente in 3 mL di terreno liquido.
4. Utilizzando le pipette a punta rotta, diluire serialmente la sospensione per tre volte di un fattore 10, con il terreno liquido.
5. Seminare 5 piastre per ogni diluizione, in profondità, nello stesso terreno addizionato di Agaragar all'1% .
6. Incubare per 15-30 giorni a +27°C; esaminare le piastre, prima ad occhio nudo in luce incidente su un fondo scuro e poi al microscopio, ogni giorno a partire dalla seconda settimana.
7. Prelevare le colonie di *Frankia*, riconoscibili al microscopio per la presenza dei tipici sporangi, eseguendo una "carota" con un'ansa sterile e isolarle in provette contenenti terreno liquido.

11.5. Osservazioni
È molto importante disinfettare accuratamente i noduli. In caso di elevate concentrazioni di polifenoli, può essere inoltre opportuno asportare gli strati superficiali del nodulo, in condizioni asettiche, prima della frantumazione.

12. Frazionamento in Gradiente di Saccarosio (Baker e O'Keefe, 1984)
È l'estensione del Metodo Diretto all'isolamento di *Frankia* da noduli radicali indotti.

12.1. Materiali ed apparecchiature
Come nel Metodo Diretto, più un Potter da 50 mL sterile.

12.2. Reagenti
Come per il Metodo Diretto.

12.3. Procedura consigliata
1. Allestire il gradiente discontinuo di saccarosio come descritto per il metodo diretto (punto 1).
2. In cappa a flusso laminare: disinfettare numerosi lobi per ogni nodulo con la soluzione di ipoclorito, agitando per 5 minuti.
3. Lavare 5 volte con abbondante H_2O distillata sterile.

4. Omogeneizzare in 25 mL della soluzione di fenolo sterile per mezzo di Potter o mortaio (sterilizzati).
5. Trasferire la sospensione sulla superficie del gradiente e centrifugare fino all'equilibrio (come al punto 3 del metodo diretto).
6. Recuperare le cellule di *Frankia* come indicato nel Metodo Diretto, diluire serialmente e seminare in un terreno di coltura agarizzato, per esempio il Qmod (Lalonde e Calvert, 1979) o l'FM (Benson, 1982).
7. Incubare e isolare le colonie come descritto negli altri metodi.

12.4. Osservazioni
Come per il Metodo Diretto. In questo caso, però, la percentuale di successo è molto maggiore.

13. Bibliografia
Baker D. and O'Keefe D. (1984), *A modified sucrose fractionation procedure for the isolation of Frankiae from actinorhizal root nodules and soil samples*. Plant and Soil, 78, 23-28.

Benson D.R. (1982), *Isolation of Frankia strains from alder actinorhizal root nodules*. Applied and Environmental Microbiology, 44, 461-465.

Blom J., Roelofsen W., Akkermans A.D.L. (1980), *Growth of Frankia AvcI1 in media containing Tween 80 as C-source*. FEMS Microbiology Letters, 9, 131-135.

Callaham D., Del Tredici P., Torrey J.G. (1978), *Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in Comptonia*. Science, 199, 899-902.

Diem H.G., Gauthier D., Dommergues Y.R. (1982), *Isolation of Frankia from nodules of Casuarina equisetifolia*. Canadian Journal of Microbiology, 28, 526-530.

Hoagland D.R., Arnon D.I. (1950), *The water-culture method for growing plants without soil*. Circular of California Agricultural Experimental Station No. 347. Berkeley, CA.

Lalonde M., Calvert H.E. (1979), *Production of Frankia hyphae and spores as an infective inoculant for Alnus species*. In: Gordon JC, Wheeler CT, Perry DA (eds) "Symbiotic nitrogen fixation for use in temperate forestry". Oregon State University, Corvallis, OR, pp. 96-110.

Lechevalier M.P., Lechevalier H.A. (1989), *Genus Frankia Brunchorst* In S.T. Williams, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.), "Bergey's manual of systematic bacteriology", Vol. 4, William & Wilkins, Baltimore.1886, 174 AL, pp. 2410-2417.

Margheri M.C., Tredici M.R., Florenzano G. (1984), *Gli attinomiceti del genere Frankia: metodi d'isolamento e d'inoculazione*. In: "Atti del Colloquio SISS Biotecnologia del suolo" a cura di W. Balloni. Firenze, 1984.

Murry M.A., Fontaine M.S., Torrey J.G. (1984), *Growth kinetics and nitrogenase induction in Frankia sp*. HFPArI3 grown in batch culture. Plant and Soil, 78, 61-78.

Rodriguez-Barrueco C. (1968), *The occurrence of the root nodule endophyte of Alnus glutinosa and Myrica gale in soils*. Journal of General Microbiology, 52, 189-194.

Smolander A., Sundman V. (1987), *Frankia in acid soils of forests devoid of actinorhizal plants*. Physiologia Plantarum, 70, 297-23.

Smolander A., Van Dijk C., Sundman V. (1988), Survival of Frankia strains introduced into soil. Plant and Soil, 106, 65-72.

Toomsan B., Rupela O.P., Mittal S., Dart P.J., Clark K.W. (1984), *Counting Cicer-Rhizobium using a plant infection technique*. Soil Biology and Biochemistry, 16, 503-507.

Van Dijk C. (1979), *Endophyte distribution in soil*. In: "Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests" (J.C. Gordon, C.T. Wheeler and D.A. Perry, Eds.), Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis, pp. 84-94.

Van Dijk C. (1984), *Ecological Aspects of Spore Formation in the Frankia-Alnus Symbiosys*. Ph. D. Thesis. University of Leiden, The Netherlands.

Metodo III.5

BATTERI PROTEOLITICI E AMMONIFICANTI

1. Introduzione

L'azoto organico di varia origine presente nel suolo è prevalentemente sotto forma di proteine. La capacità di degradare le proteine è ampiamente diffusa nella microflora, così come è presente in organismi vegetali e animali. I primi due passaggi del processo sono un'idrolisi ad opera di vari tipi di enzimi, che porta dalla molecola proteica a peptoni, peptidi ed infine a singoli aminoacidi, e la successiva deaminazione che libera il gruppo aminico NH_2 come NH_3, prima forma di azoto inorganico a comparire.
A questi due successivi processi possono essere fatti corrispondere due distinti gruppi fisiologici di microganismi, i proteolitici, idrolizzanti, e gli ammonizzanti o ammonificanti, mineralizzatori ad ammonio. Moltissimi batteri, aerobi ed anaerobi e compresi gli attinomiceti, nonché funghi, sono in grado di mineralizzare l'azoto organico proteico.
La capacità proteolitica può essere evidenziata dalla crescita in terreni colturali a base di proteine o, più specificamente, dalla capacità di fluidificare la gelatina, idrolizzando questo materiale proteico ed impedendogli così di gelificare. Si può effettuare una conta in piastra con terreni colturali gelificati con la sola gelatina, contando le colonie in corrispondenza delle quali si ha appunto fluidificazione, ma ciò impedisce l'incubazione oltre i +20°C. D'altra parte impiegando agar come gelificante accanto alla gelatina, l'idrolisi di quest'ultima deve venire evidenziata con appositi reattivi. Si ritiene più semplice ed affidabile ricorrere alla metodica del MPN utilizzando un terreno colturale a base di gelatina in provetta ed incubando anche per la ricerca di questo gruppo microbico a +28°C. La perdita della gelificabilità viene evidenziata a fine incubazione abbassando la temperatura a pochi gradi.
Il saggio più specifico per l'avvenuta ammonificazione è invece l'accumulo, in condizioni non limitanti per l'azoto, di NH_3/NH_4^+, rilevabile con reattivi quali quello di Nessler. Si può perciò ricorrere a terreni colturali liquidi per il calcolo del MPN, nei quali viene appunto ricercato qualitativamente l'ammonio come criterio per assegnare la positività di crescita.

2. Soluzioni, terreni colturali e reattivi

2.1. Soluzione di oligoelementi

In 1 litro di acqua distillata, 50 mg ciascuno di $K_2MoO_4 \bullet 5H_2O$, $Na_2B_4O_7 \bullet 10\ H_2O$, $Co(NO_3)_2 \bullet 6H_2O$, $MnSO_4$, $CdSO_4$, $CuSO_4 \bullet H_2O$, $ZnSO_4 \bullet 7H_2O$ e 100 mg di $FeCl_3$; può essere stoccata non sterile. Far passare una corrente di CO_2 nella soluzione.
Soluzione di Winogradsky (Pochon & Tardieux, 1962): per litro di acqua distillata: K_2HPO_4 5 g, $MgSO_4$ 2,5 g, NaCl 2,5 g, $Fe_2(SO_4)_3$ 50 mg, $MnSO_4$ 50 mg, soluzione di oligoelementi 1 mL; sterilizzare.
Reattivo di Nessler: soluzione A: HgI_2 50 g, KI 36,5 g, H_2O distillata 1000 mL, triturare in mortaio; soluzione B: KOH 150 g, H_2O distillata 1000 mL; al momento dell'uso mescolare le due soluzioni in parti uguali.
Terreno colturale per proteolitici (Pochon & Tardieux, 1962): soluzione di oligoelementi 1 mL, soluzione di Winogradsky 50 mL, gelatina 30 g, portare a 1000 mL con acqua distillata; la gelatina va sciolta a caldo; fino alla distribuzione nelle provette il terreno colturale va mantenuto nettamente sopra i +20°C; regolare il pH a 7,2; distribuire in provette da circa 20 mm di diametro, 4 mL ciascuna, e sterilizzare a +110°C per 20 minuti.

Terreno colturale per ammonificanti (Pochon & Tardieux, 1962): in 950 mL di acqua distillata, soluzione di Winogradsky 50 mL, soluzione di oligoelementi 1 mL, asparagina 0,2 g; regolare il pH a

6,8; distribuire in provette da circa 20 mm di diametro, 10 mL ciascuna, e sterilizzare a +110°C per 20 minuti.

3. Procedura consigliata per i proteolitici

Si effettua una conta mediante MPN in un terreno colturale che si presenta liquido a temperature superiori a circa +20°C. Seminare aliquote di 1 mL delle sospensioni-diluizioni del campione, indicativamente da
10^{-3} a 10^{-9}. Incubare a +28°C per 15 giorni. Porre per 1 h in bagnomaria a pochi °C. Le provette in cui il terreno colturale si è mantenuto liquido vengono considerate positive per la crescita dei proteolitici.

4. Procedura consigliata per gli ammonificanti

Si effettua un conteggio mediante MPN in terreno colturale liquido. Seminare aliquote di 1 mL delle sospensioni-diluizioni del campione, indicativamente da 10^{-3} a 10^{-9}. Incubare a +28°C per 15 giorni. Su 1 mL di coltura posto in provetta pulita (conservare il resto per eventuali verifiche) far cadere 2 gocce di reattivo di Nessler. La presenza di ammonio denotante crescita di ammonificanti è rivelata da una colorazione arancio più o meno spiccata.

5. Bibliografia

Pochon J., Tardieux P. (1962), *Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol*. Editions De La Tourelle, St.Mandé, France.

Metodo III.6

BATTERI NITRIFICANTI

1. Introduzione

La coltivazione e la determinazione della carica dei due gruppi di nitrificanti, i nitrosanti (ammonio-ossidanti) e i nitricanti (nitrito-ossidanti), possono essere condotte su terreni colturali agarizzati o supportati da gel di silice (Soriano & Walker, 1973; Mahasneh et al., 1984), ma presentano alcuni gravi problemi che la rendono poco vantaggiosa: in particolare, è pressoché impossibile raggiungere la completa selettività per gli autotrofi, evitando la crescita di eterotrofi su tracce di sostanza organica; inoltre, le colonie di nitrificanti sono a malapena visibili ad occhio nudo.
I sistemi di conteggio tuttora più semplici ed affidabili prevedono in effetti terreni colturali minerali liquidi, in cui non si evita la crescita di eterotrofi ma è la rilevazione del risultato ad essere estremamente selettiva dato l'uso di reattivi specifici per nitriti e nitrati. Unico inconveniente è la lentezza di crescita dei nitrificanti autotrofi: si può a volte arrivare a 55 giorni per avere la massima conta dei nitrosanti e addirittura a 100 per i nitricanti. Questo risulta dipendere anche dalle specie batteriche coinvolte. Il pH considerato ottimale per le varie specie è 7,5-8; terreni colturali con pH oltre 8 hanno a volte fornito risultati poco attendibili (Belser, 1979; Watson et al., 1989). Può facilitare la rilevazione del risultato la presenza nel terreno colturale di un indicatore di pH, il cui viraggio costituisce un buon indizio della crescita di nitrificanti, da confermare con i reattivi specifici (Schmidt & Belser, 1982).

2. Soluzioni, terreni colturali e reattivi

2.1. Soluzione di Winogradsky (Pochon & Tardieux, 1962)

Per litro di acqua distillata: K_2HPO_4 5 g, $MgSO_4$ 2,5 g, NaCl 2,5 g, $Fe_2(SO_4)_3$ 50 mg, $MnSO_4$ 50 mg, soluzione di oligoelementi 1 mL; sterilizzare a +110°C per 20 minuti.

2.2. Soluzione di oligoelementi (Pochon & Tardieux, 1962)

Disciogliere in 1 litro di acqua distillata 50 mg ciascuno di $K_2MoO_4{\bullet}5H_2O$, $Na_2B_4O_7{\bullet}10\ H_2O$, $Co(NO_3)_2{\bullet}6H_2O$, $MnSO_4$, CdSO4, $CuSO_4{\bullet}H_2O$, $ZnSO_4{\bullet}7H_2O$ e 100 mg di $FeCl_3$; può essere stoccata non sterile. Far passare una corrente di CO_2 nella soluzione.

2.3. Terreno colturale per nitrosanti (Pochon & Tardieux, 1962)

Aggiungere a 950 mL di acqua distillata: soluzione di Winogradsky 50 mL, $(NH_4)_2SO_4$ 0,5 g, $CaCO_3$ 1 g; portare il pH a 7,5; distribuire in provette da circa 16 mm di diametro, 2 mL ciascuna, e sterilizzare a +110°C per 20 minuti; con la sterilizzazione il pH può aumentare lievemente.

2.4. Terreno colturale per nitricanti (Pochon & Tardieux, 1962)

In 950 mL di acqua distillata: soluzione di Winogradsky 50 mL, $NaNO_2$ 1 g, $CaCO_3$ 1 g; portare il pH a 8; distribuire in provette da circa 16 mm di diametro, 2 mL ciascuna, e sterilizzare a +110°C per 20 minuti; con la sterilizzazione il pH può diminuire lievemente.
Reattivo alla difenilamina: sciogliere 1 g di difenilamina in 100 mL di H_2SO_4 95-97%; versare in 20 mL di acqua distillata (non versare l'acqua nell'acido, per evitare pericolosi spruzzi).

3. Procedura consigliata

Si effettua una conta mediante MPN in terreni colturali liquidi con pH vicini a 8. Seminare aliquote di 1 mL delle sospensioni-diluizioni del campione da 10^{-1} a 10^{-7}. Incubare a +28°C per almeno 40 giorni

per i nitrosanti e 60 per i nitricanti. Per una rilevazione più accurata, effettuare rilevazioni settimanali su una goccia di coltura, prelevata senza agitazione per non sollevare la terra nelle prime diluizioni, fino ad avere costanza di MPN per almeno due settimane.
Per la rilevazione dei risultati relativi ai nitrosanti si valuta la comparsa di nitriti e/o nitrati mediante reattivo alla difenilamina, sensibile indifferentemente ai due anioni. Nelle provette in cui sono cresciuti i nitrosanti, ma solo in esse, il nitrito può essere stato ulteriormente ossidato a nitrato ad opera di nitricanti contemporaneamente presenti. Sarebbe perciò rischioso e fonte di false negatività impiegare un reattivo sensibile ai soli nitriti. In ogni caso se sono presenti solo nitricanti non si può avere alcuna ossidazione dell'ammonio, perciò il conteggio è riferibile ai soli nitrosanti. Per la rilevazione, su una goccia o pochi decimi di mL di coltura posti in provetta pulita pipettare 0,5 mL di H_2SO_4 95-97% e successivamente 1,5 mL di reattivo. Un colore blu cupo entro pochi secondi indica risultato positivo (presenza di nitrato e/o nitrito).
Per l'evidenziazione della crescita dei nitricanti, si rileva la presenza di nitrati dopo eliminazione per via chimica degli eventuali nitriti rimasti nel terreno colturale. Si procede perciò dapprima all'aggiunta, a una goccia o pochi decimi di mL di coltura posti in provetta pulita, di circa 50 mg di urea e 0,5 mL di H_2SO_4 20% in acqua. Agitare e bagnare bene tutta la parete interna della provetta. Versare l'eccesso di liquido e lasciare solo un fondo di provetta. Aggiungendo 1,5 mL di reattivo alla difenilamina, la comparsa di blu cupo non può essere dovuta ad altro che a nitrati e costituisce risultato positivo per il test, da utilizzare per il calcolo del MPN.

4. Bibliografia

Belser L.W. (1979), *Population ecology of nitrifying bacteria*. Annual Review of Microbiology, 33, 309-333.

Mahasneh A., Budour S., Doddema H. (1984), *Nitrification and seasonal changes in bacterial populations in the rhizosphere of Suaeda and Arthrocnemum species growing in saline soils*. Plant and Soil, 82, 149-154.

Pochon J., Tardieux P. (1962), *Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol*. Editions De La Tourelle, St.Mandé, France.

Schmidt E.L., Belser L.W. (1982) *Nitrifying bacteria*. In: Methods of Soil Analysis (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney, Eds.), Part 2, pp. 1027-1042.

Soriano S., Walker N. (1973), *The nitrifying bacteria in soils from Rothamsted classical fields and elsewhere*. Journal of Applied Bacteriology, 36, 523-529.

Watson S.W., Bock E., Harms H., Koops H.P., Hooper A.B. (1989), *Family Nitrobacteraceae Buchanan* 1917. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig and J.G. Holt, Eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 3, pp. 1808-1834.

Metodo III.7

BATTERI DENITRIFICANTI

1. Introduzione

Fondamentalmente un buon test per il conteggio dei batteri denitrificanti deve basarsi su due elementi: l'accertamento della scomparsa dell'accettore di elettroni (nitrato o nitrito) aggiunto al mezzo di coltura e la rilevazione della formazione di azoto gassoso che confermi l'avvenuta denitrificazione. La seconda verifica è resa necessaria dal fatto che in condizioni di anaerobiosi (Tiedje, 1982) NO_3^- e NO_2^- possono essere utilizzati da alcuni microrganismi che ne operano la riduzione disassimilativa a NH_4^+ senza giungere al prodotto finale N_2: ciò permette di evitare la perdita di azoto da parte del sistema.
Sebbene non privo di inconvenienti legati soprattutto alla nocività per l'analista dei reattivi impiegati, il metodo di Focht e Joseph (1973) modificato da Tiedje (1982), continua ad essere il più affidabile e di semplice esecuzione. Esso é basato sull'impiego di un mezzo liquido esente da carboidrati (Nutrient Broth Difco) arricchito con NO_3^- e sull'osservazione della scomparsa del nitrato e della formazione di bolle di N_2. L'elevata probabilità che le bolle di gas siano costituite, impiegando Nutrient Broth, solo da azoto molecolare è stata accertata da Gamble et al.(1977).

2. Vetrerie, terreni colturali e reattivi

Provette per batteriologia 16 x 160, campane di Durham, contenitori a tenuta ermetica (Gaspak anaerobic Jar, BBL).

2.1. Terreno colturale per denitrificanti (Focht e Joseph, 1973)

Reidratare 9 g di Nitrate Broth Difco (Nutrient Broth + nitrato) in 1000 mL di acqua distillata; distribuire in provette da 16 mm di diametro corredate con la campana di Durham (Tiedje, 1982) in ragione di 10 mL per provetta e sterilizzare in autoclave a +120 °C per 15 minuti.

2.2. Reattivo di Bray per nitrati e nitriti (Bray, 1945)

Mescolare, dopo triturazione fine in un mortaio, 10 g di $MnSO_4 \bullet H_2O$, 2 g di polvere di zinco, 4 g di acido sulfanilico e 2 g di alfa-naftilamina; aggiungere poi con cura 100 g di $BaSO_4$ e 75 g di acido citrico. La polvere va conservata in un recipiente scuro, al riparo dalla luce perché la naftilamina è fotosensibile, con viraggio dal grigio al rosa.

2.3. Reattivi per l'eliminazione dell'ossigeno nei contenitori ermetici

Gaspak Anaerobic System, BBL.

3. Procedura consigliata

Come già indicato sopra si procede ad una conta mediante MPN in mezzo liquido a pH neutro. I tubi con il mezzo di coltura (preferibilmente cinque tubi per diluizione) vengono inoculati con 1 mL delle sospensioni diluizioni del campione di suolo preparate a parte, da 10^{-2} a 10^{-7}, e incubati a +28°C nei contenitori ermetici nei quali si instaurano condizioni di anaerobiosi tramite il sistema Gaspak indicato al paragrafo precedente. Dopo 14 giorni di incubazione si esaminano i tubi per la produzione di gas scartando quelli che non presentano bolle dentro la campana di Durham. Sui rimanenti si procede alla ricerca dell'effettiva scomparsa di nitrati e nitriti nel modo seguente: si svuotano parzialmente i tubi lasciando circa 1 mL di mezzo in ciascun tubo, si aggiungono alcune gocce di acido acetico glaciale e si versa nei singoli tubi della polvere di Bray in quantità pari ad una punta di spatola. L'assenza di colorazione rossa indica che tutto il nitrato è stato denitrificato.

Il numero dei batteri denitrificanti potrà essere determinato annotando i tubi positivi per ciascuna diluizione e facendo riferimento alle tavole statistiche di McCrady o di Cochran.

4. Bibliografia

Bray R.H. (1945), *Nitrates tests for soil and plant tissues*, Soil Sci., 60, 219-221.

Focht D.D., Joseph H. (1973), *An improved method for the enumeration of denitrifying bacteria* Soil Sci. Soc. Am. Proc., 37-5, 698-699.

Gamble T.N., Betlach M.R., Tiedje J.M. (1977), *Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils*. Appl. Environ. Microbiol., 33, 926-939.

Tiedje J.M. (1982), *Denitrification* In: Methods of Soil analysis (Page et al. eds.) Am Soc. of Agron., Inc., Madison, Wis. Part 2, Agronomy, 9, pp.1011-1025.

Metodo III.8

GRUPPI FISIOLOGICI DEL CICLO DEL CARBONIO

1. Introduzione

Una parte considerevole del ciclo del carbonio consiste nella degradazione dei polimeri vegetali e questo processo è particolarmente importante nell'ambiente terrestre. Le piante rappresentano la fonte principale di carbonio organico nel suolo e i microrganismi del suolo sono i maggiori responsabili della trasformazione dei loro polimeri. Come conseguenza dell'attività microbica, l'anidride carbonica viene reintrodotta nell'atmosfera, viene formato materiale umico e composti più semplici vengono resi disponibili alle altre popolazioni microbiche.
La cellulosa, l'amido, la pectina e la lignina sono i principali polimeri di origine vegetale presenti nel suolo.

2. Cellulosolitici

I responsabili della degradazione della cellulosa possono essere funghi, attinomiceti e batteri sia aerobi che anaerobi. La degradazione della cellulosa può avvenire in un ampio spettro di condizioni chimico-fisiche. Esistono due gruppi di microrganismi che svolgono cellulolisi in anaerobiosi: i mesofili (+28-35°C) ed i termofili (+55-70°C). Funghi e attinomiceti sono rari in ambienti anaerobi ed il processo di cellulolisi a carico dei batteri è molto lento. La cellulolisi anaerobia è trascurabile in suoli ben drenati.

2.1. Cellulosolitici aerobi: Conta su piastra a doppio strato (Kluepfel, 1988)

L'attività cellulosolitica è dimostrata dall'idrolisi del substrato (cellulosa) aggiunto come unica fonte di carbonio ad un terreno agarizzato distribuito in piastre Petri. Il principio per la determinazione numerica dei microrganismi cellulosolitici è quello della conta per diluizione su piastra, distinguendo le colonie che mostrano l'alone di idrolisi dalle altre. In alternativa al metodo tradizionale si propone un metodo a doppio strato che rende più evidenti gli aloni.

2.1.1. Terreno colturale (Tansey, 1971)

Cellulosa Avicell 5 g
(oppure cellulosa trattata con acidi*, 5 g)

$NH_4H_2PO_4$	2 g
KH_2PO_4	0,6 g
K_2HPO_4	0,4 g
$MgSO_4{\bullet}7H_2O$	0,8 g
Tiamina	0,1 mg
Adenina	4 mg
Adenosina	8 mg
Estratto di lievito	0,5 g
Agar	17 g
H_2O deionizzata	1 L

*Cellulosa trattata con acidi (Demain and Solomon ,1986).
(Operare in camera fredda o in bagno di ghiaccio).

Porre 30 gr di cellulosa Whatman in polvere essiccata all'aria in un beaker da 5 litri. Aggiungere lentamente 800 mL di acido orto-fosforico concentrato (85%) agitando vigorosamente con agitatore magnetico per 2 h. Aggiungere 2 L di acqua fredda continuando ad agitare. Recuperare il materiale in sospensione centrifugando a 4000 g e sospendere il pellet in 5 L di acqua distillata fredda; centrifugare

nuovamente. Sospendere il pellet in 1 L di $NaCO_3$ al 2% e omogeneizzare per 5 minuti alla massima velocità in un omogeneizzatore, lasciando poi per 12 h a +4°C (non congelare). Lavare il prodotto in 5 L di acqua distillata fredda su filtro e risospendere in 15 L di acqua distillata fredda. Recuperare centrifugando a 10000 xg per 5 minuti e successivamente omogeneizzare per 5 min. La sospensione ottenuta dovrebbe avere un pH pari a 6.5±0.1 Essiccare a +80°C o utilizzare direttamente calcolando il contenuto di cellulosa della sospensione come media del peso secco di tre campioni da 1 mL ciascuno.

2.1.2. Procedura consigliata
Preparare una seconda aliquota di terreno colturale identico al primo ma privo di cellulosa. Sterilizzare entrambe in autoclave a +121°C per 15 minuti. Versare nelle piastre Petri un primo strato (15 mL) del terreno colturale privo di cellulosa, lasciar raffreddare e versare un secondo strato (5 mL) del terreno contenente cellulosa. Dopo adeguata asciugatura inoculare le piastre in superficie con le sospensioni-diluizioni di suolo opportune, incubare a +28°C per 7-14 giorni.

2.1.3. Risultati
Contare le colonie totali e successivamente quelle circondate da un alone più trasparente. Esprimere i risultati come numero di organismi cellulolitici per grammo di suolo o come percentuale sugli organismi totali che crescono su questo terreno.

2.1.4. Osservazioni
Nonostante sia il metodo più descritto in letteratura esso presenta molte difficoltà di applicazione. Non è sempre facile distinguere l'alone intorno alle colonie soprattutto nei funghi nei quali l'area idrolizzata non si estende intorno al bordo della colonia ma resta nascosta al di sotto di essa. Si suggerisce l'uso di sorbosio (1% p/v) per ridurre la dimensione delle colonie fungine. Una più bassa concentrazione del substrato rende il metodo più sensibile, ma diminuisce il contrasto tra substrato e alone.
Il trattamento della cellulosa con acido solforico dà risultati più apprezzabili.

2.2. Conta su piastra con CMC (Kluepfel, 1988)
La carbossimetilcellulosa CMC è un derivato solubile della cellulosa che viene facilmente degradato dai microrganismi. Alla fine del periodo di incubazione le piastre vengono trattate con soluzione acquosa di Rosso Congo che evidenzia un alone di idrolisi arancione chiaro intorno alle colonie attive.

2.2.1. Terreno colturale (Hankin et Anagnostakis, 1977)

$(NH_4)_2SO_4$	1 g
KH_2PO_4	2 g
Na_2HPO_4	3 g
$FeSO_4 \bullet 7H_2O$	0,1 g
$CaCl_2$	0,5 mg
Elementi in tracce*	1 mL
Estratto di lievito	1 g
CMC	5 g
Agar	10 g
Acqua deionizzata	1 L

*Elementi in tracce: H_3BO_3 10 mg; $MnSO_4$ 10 mg; $ZnSO_4$ 70 mg; $CuSO_4$ 50 mg; MoO_3 10 mg; acqua deionizzata 1 L.

Il pH del terreno colturale raccomandato dagli autori è 7, dato che sia i batteri che la maggior parte dei funghi crescono bene a questo pH. Lo stesso terreno può essere usato a pH 5 per mettere in evidenza quelle specie fungine che non possono svilupparsi a pH superiori.

2.2.2. Procedura consigliata
Aggiungere lentamente alla soluzione la CMC agitando continuamente. Per ridurre le dimensioni delle colonie fungine aggiungere al terreno prima di autoclavare sorbosio all'1%. Sterilizzare a +121°C per 20 minuti e versare in piastre Petri. Inoculare le piastre con le sospensioni-diluizioni di suolo ed incubare a +28°C per 4-9 giorni.

2.2.3. Risultati
Ricoprire le piastre di una soluzione acquosa (0,1%) di Rosso Congo (20 minuti), rimuovere il colorante, fissare con NaCl 5 M (20 minuti) e rilevare il numero di colonie che presentano un alone più trasparente arancio chiaro.

2.2.4. Osservazioni
La combinazione ideale agar (1%) e CMC (0,5%) garantisce i risultati migliori in termini di dimensione dell'alone. Un effetto negativo viene esercitato da un elevato grado di sostituzione della CMC.

2.3. Saggio colorimetrico con Remazol Brilliant Blue per MPN
(Moore e al.,1979; Poincelot and Day, 1972)
Il colorante Remazol Brilliant Blue (RBB) si lega covalentemente alla cellulosa e viene rilasciato nel mezzo per l'azione idrolizzante delle cellulasi microbiche, in proporzione alla frazione di polimero degradata. Il rilascio del colorante nel mezzo offre un metodo sensibile per determinare i tubi positivi nella stima del Most Probable Number (MPN).

2.3.1. Terreno colturale
Si utilizza lo stesso terreno descritto per il metodo n *9.2.2.*, privo di agar.

2.3.2. Preparazione delle strisce di cellulosa
Può essere utilizzato un film trasparente di cellulosa (Cellophane) tagliato in strisce (2x5 cm). Far bollire 100 strisce (3 g) in 500 mL di acqua distillata per due volte per eliminare i plastificanti. Dopo il secondo cambio di acqua sospendere le strisce in ulteriori 500 mL di acqua distillata e riscaldare, sotto agitazione, fino alla temperatura di +80°C. Aggiungere 1,5 g di RBB e successivamente 5 aliquote da 20 mL di soluzione acquosa di Na_2SO_4 (30%) ogni 2 minuti. Aggiungere 2,5 g di $Na_3PO_4 \bullet 12H_2O$ disciolto in 15 mL di acqua e mantenere alla temperatura di +80°C per 20 minuti. Risciacquare le strisce in acqua calda fino a scomparsa di colorazione e autoclavare a +121°C per 15 minuti. in un L di acqua distillata per rimuovere ogni traccia di colorante e lasciare asciugare all'aria. Disporre una striscia di cellophane in tubi sterili contenenti il terreno colturale e inoculare con le opportune sospensioni-diluizioni di suolo. Incubare 7-14 giorni a +28°C.

2.3.3.Risultati
Sono considerati positivi i tubi che mostrano presenza di colorante nel mezzo colturale. Calcolare il MPN utilizzando le apposite tabelle .

2.3.4. Osservazioni
Il film di cellophane trattato con RBB può essere utilizzato anche in alternativa alla cellulosa incorporata nel mezzo colturale per la conta su piastra sovrapponendo un disco del film all'agar.
E' reperibile in commercio una cellulosa in polvere già colorata ("Cellulose azure") da utilizzare in doppio strato in tubi contenenti un terreno minerale agarizzato. L'attività cellulosolitica viene evidenziata dal diffondersi del colorante dallo strato superiore a quello inferiore della provetta. In realtà da alcune prove effettuate risulta che una certa diffusione del colorante può avvenire anche nei tubi non inoculati.

3. Cellulosolitici anaerobi

3.1. Stima del MPN in tubo (Pochon , 1954)
Il metodo si basa sulla stima del MPN di microrganismi cellulosolitici anaerobi rivelati attraverso la degradazione di strisce di carta incubate in anaerobiosi in presenza di sospensioni-diluizioni di suolo.

3.1.1. Terreno colturale

Soluzione salina standard*	50 mL
$NO_3(NH_4)$	2 g
Peptone	1 g
$CaCO_3$	10 g
Acqua deionizzata	1 L

*Soluzione salina standard:
K_2HPO_4 5 g; K_2HPO_4 2,5 g; NaCl 2,5 g; $Fe_2(SO_4)_3$ 0,05 g; $MnSO_4$ 0,05 g; acqua deionizzata 1L.

3.1.2. Procedura consigliata
Portare a pH 7,2 con soda, ripartire in tubi agitando spesso per riportare il carbonato in sospensione. Aggiungere in ogni tubo una striscia di carta (1x6 cm) di cellulosa pura (per esempio, carta Whatman n° 1) chiudere e sterilizzare a +121°C per 15 minuti. Inoculare almeno tre tubi per diluizione con 1 mL delle sospensioni-diluizioni di suolo opportune. Incubare in cappa o giara anaerobia a +28°C per 15 giorni agitando occasionalmente per riportare in sospensione il carbonato.

3.1.3. Risultati
Calcolare il MPN considerando positivi i tubi nei quali si verifica il rammollimento della carta e/o la comparsa di macchie gialle e brune sulla sua superficie cui corrispondano zone visibilmente intaccate (per esempio, maggiore trasparenza della cellulosa).

3.1.4. Osservazioni
Si tratta di un metodo piuttosto antiquato che richiede notevole tempo di preparazione e i cui risultati sono piuttosto imprecisi. Permette di ottenere comunque un indice comparabile in caso di suoli di diversa origine. La stessa tecnica può essere utilizzata per determinare i cellulosolitici aerobi incubando i tubi in ambiente aerobio.

4. Amilolitici
L'amido contiene due polimeri del glucosio, l'amilosio e l'amilopectina. Sono numerosissimi i batteri e i funghi del suolo capaci di idrolizzare l'amido producendo enzimi extracellulari.

4.1. Conta su piastra (Wollum, 1982)
Il numero dei microrganismi amilolitici presenti in un campione di suolo viene stimato inoculando le sospensioni-diluizioni su un terreno colturale contenente amido come unica fonte di carbonio. L'attività amilolitica delle colonie viene rivelata con la soluzione iodata di Gram che forma con l'amido un complesso blu scuro. Le colonie che mostrano un alone giallo chiaro sono da considerarsi positive per l'attività amilolitica.

4.1.1. Terreno colturale

Amido solubile	10g
Estratto di lievito	1g
$NaNO_3$	1g
KCl	0,5g

$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	0,5g
Agar	17g
H_2O deionizzata	1L

In alternativa a questo terreno colturale viene proposto Agar Nutriente addizionato con 0,2% di amido solubile (Hankin et Anagnostakis, 1975).

4.1.2. Procedura consigliata
Sterilizzare a +121°C per 15 minuti e versare in piastre Petri. Inoculare le piastre con le appropriate sospensioni-diluizioni di suolo e incubare 7 giorni a +28°C.

4.1.3. Risultati
Ricoprire la superficie della piastra con la soluzione di Gram* e contare le colonie che presentano un alone chiaro intorno alla superficie di crescita. L'assenza dell'alone indica che l'amido non è stato utilizzato dal microrganismo. È possibile esprimere i risultati come numero di microrganismi amilolitici per grammo di suolo oppure come percentuale di amilolitici rispetto al numero totale di colonie cresciute sulla piastra.

*Soluzione iodata di Gram : I 1g; KI 2g; acqua distillata 200 mL.

4.1.4. Osservazioni
La colorazione con iodio rappresenta ancora il metodo più rapido e semplice di visualizzazione degli amilolitici. Nel caso sia necessario un isolamento occorre trasferire immediatamente la colonia su un terreno adatto perché lo iodio ha proprietà antimicrobiche.
Altri metodi di rilevamento dell'attività amilolitica prevedono l'uso di amido complessato con coloranti e particolari metodi di preparazione dell'amido che rendono gli aloni più evidenti senza l'aggiunta di coloranti. Tutti i metodi su piastra sono in grado di indicare anche l'intensità dell'attività enzimatica che può essere misurata come diametro dell'alone di idrolisi intorno alla colonia.

5. Microtecnica per MPN
Lo stesso terreno colturale descritto nel primo metodo, privo di agar, viene utilizzato per operare contemporaneamente sia la diluizione (1:2) della sospensione di suolo sia la crescita dei microrganismi. L'operazione viene effettuata utilizzando piastre sterili per microtitolazioni a 96 pozzetti (8x12). Il campione viene diluito 12 volte con otto repliche.

5.1.1. Procedura consigliata
Si utilizza lo stesso terreno della tecnica su piastra, privo di agar. Ripartire il terreno liquido nelle piastre per microtitolazioni in ragione di 0,05 mL per pozzetto. Partendo dalla sospensione-diluizione di suolo opportuna trasferire 0,05 mL di campione in tutti i pozzetti della prima colonna. Procedere con la diluizione su ogni fila trasferendo 0,05 mL di sospensione dal primo pozzetto al successivo per 12 volte. Incubare 7 giorni a +28°C chiudendo le piastre con parafilm per evitare l'evaporazione.

5.1.2. Risultati
Evitando di agitare le piastre, far cadere una goccia di soluzione di Gram in ogni pozzetto e registrare come positivi quelli che rimangono incolori. Utilizzare una tabella MPN basata su diluizioni 1:2 invece che 1:10.

5.1.3. Osservazioni
La tecnica MPN in piastre per microtitolazioni, messa a punto nel nostro laboratorio, deriva dalla vecchia metodica in tubo ed è stata applicata per la prima volta allo studio dei nitrificanti. Essa offre

molti vantaggi sia in termini di precisione, dovuta al maggior numero di repliche (8 invece di 5), sia perché permette un notevole risparmio di spazio e materiali utilizzati.

6. Pectinolitici

Le pectine consistono di catene non ramificate di acido D-galatturonico riunite mediante legami η-(1,4) glucosidici. I gruppi carbossilici sono esterificati parzialmente o totalmente con metanolo. La degradazione microbica delle pectine avviene ad opera degli enzimi pectinolitici (esterasi, glucosidasi e liasi). Nel suolo, il numero dei microrganismi pectinolitici è abbastanza elevato (circa 10^5 cellule/g di suolo).

6.1. Conta su piastra

Il metodo si basa su una semina di sospensioni-diluizioni di suolo su agar contenente pectina. L'alone di idrolisi viene messo in evidenza da una sostanza che, precipitando la pectina integra, opacizza lo strato di agar circostante rendendo visibile una zona trasparente intorno alle colonie che hanno idrolizzato la pectina.

6.1.1. Terreno colturale

Pectina (demetilata a pH 8.6)	5.0 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \bullet 7H_20$	0,1 g
NaCl	0,2 g
$CaCl_2 \bullet 2H_2O$	0,2 g
$FeCl_3 \bullet 6H_2O$	0,01 g
Estratto di lievito	1,0 g
Agar	20,0 g
Acqua deionizzata	1 L

6.1.2. Procedura consigliata

Sterilizzare il terreno a +121°C per 15 minuti. e versarlo nelle piastre. Inoculare le appropriate diluizioni-sospensioni di suolo sulle piastre e incubare a +28°C per 72 h.

6.1.3. Risultati

Versare sulle piastre una soluzione acquosa all'1% di bromuro di cetiltrimetilammonio lasciando agire 20-30 minuti per evidenziare l'alone chiaro intorno alle colonie. È possibile esprimere i risultati come numero di microrganismi pectinolitici per grammo di suolo oppure come percentuale di pectinolitici rispetto al numero totale di colonie cresciute sulla piastra.

6.1.4. Osservazioni

Il diametro della zona chiara è correlabile al potenziale decompositivo del microrganismo. È possibile isolare i pectinolitici replicando la colonia non appena si evidenzia l'alone. Un terreno colturale capace di distinguere l'attività pectatoliasica da quella poligalatturonasica viene descritto da Hankin e al. (1971) e si basa su una differenziazione del pH dello stesso mezzo colturale.

7. Ligninolitici

Le lignine sono polimeri fenolici condensati che presentano legami irregolari carbonio-carbonio molto stabili e legami eterei tra le unità fenilpropanoidi. I microrganismi che degradano le lignine, data la complessità e diversità delle molecole di questi polimeri e, di conseguenza, le difficoltà metodologiche di dosaggio, non possono essere determinati utilizzando i metodi microbiologici tradizionali.

In questo capitolo verranno descritti tre metodi che, nonostante i molti limiti, possono consentire di ottenere una stima dell'attività ligninolitica di un ambiente naturale senza ricorrere all'uso di sostanze marcate.
Il primo metodo valuta l'attività ligninolitica di un suolo misurando la perdita di peso di campioni di materiale lignocellulosico naturale incubati direttamente nell'ambiente naturale e prelevati a diversi intervalli di tempo.
È possibile applicare questo metodo accoppiandolo al secondo qui descritto che si basa sull'estrazione e dosaggio della lignina, mediante trattamenti chimici, dai materiali lignocellulosici.
Il terzo metodo si basa sulla determinazione dell'attività ligninolitica mediante coloranti polimerici utilizzati come molecole modello della lignina.

7.1. Perdita di peso di materiali lignocellulosici (Johansson et al., 1986)
Preparazione del campione. 1,5 g del materiale lignocellulosico naturale (p. es. aghi di pino) in esame viene posto in sacchetti di garza in poliammide (10 cm x 10 cm) con pori di 0,5 mm. I sacchetti vengono chiusi e posti nel suolo in esame che è stato diviso in parcelle distribuite a blocchi randomizzati secondo gli scopi dello sperimentatore. I sacchetti vengono prelevati a tempi diversi e portati in laboratorio, puliti, seccati per 48 h a +85°C e pesati individualmente. Infine i campioni di ogni blocco vengono mescolati, macinati e passati su un setaccio da 40 mesh.

7.2. Calcolo della perdita di peso del campione lignocellulosico
Le perdite di peso nel tempo vengono calcolate sia sui campioni individuali che su quello mediato di ogni singolo blocco. Assumendo che la degradazione del materiale lignocellulosico segua una cinetica di 1° ordine la velocità di decomposizione verrà calcolata:

$$V_{dec}=-dA/dt=-kA$$

dove V_{dec} rappresenta la velocità di decomposizione (g • giorni^{-1}), A la quantità della materia organica presente (g) e k la costante di velocità di decomposizione (g • giorni^{-1}). Integrando si otterrà:

$$\ln A/A_o=-kt$$

dove A_o è la quantità di A al tempo 0. Se si riporta il ln (A/A_o) in ordinata e il tempo in ascissa, si otterrà una retta con una pendenza uguale a -k. La costante di velocità di decomposizione è indipendente dalla concentrazione del substrato dato che la pendenza è costante nel tempo. Il tempo richiesto per trasformare metà del substrato iniziale sarà calcolato:

$$\ln|(A_o/2)/A_o|=-kt_{1/2}$$

dove A_o è la quantità di materiale al tempo 0, k la costante di velocità di degradazione e $t_{1/2}$ il tempo di dimezzamento. Per cui si avrà:

$$t_{1/2}=0.693/k$$

8. Dosaggio chimico delle lignine
L'isolamento della lignina che generalmente si trova strettamente associata ai polisaccaridi è molto difficile. Esistono vari metodi di estrazione e determinazione della lignina, ma nessuno di essi consente di isolare la molecola naturale senza modificarne la struttura e le proprietà. Vengono proposti due diversi metodi.

8.1. Lignina di Klason
Il procedimento di Klason è il metodo standard con cui vengono analizzati i materiali vegetali per determinare il contenuto di lignina. Per la determinazione della frazione insolubile sono stati utilizzati

i metodi descritti da Effland (1977) e da Johansson e al. (1986) e per la frazione solubile della lignina il metodo descritto da Musha e Goring (1974).
Ad 1 g del materiale macinato, accuratamente pesato e posto in un beaker da 50 mL, vengono aggiunti 10 mL di H_2SO_4 al 72%. Si agita la sospensione con una bacchetta di vetro e si lascia in un bagno termostatico per due ore a +18-20°C, agitando occasionalmente. Aggiungere quindi acqua fino a raggiungere il volume di 400 mL e far bollire a riflusso per quattro ore. A tale scopo il campione viene posto in un pallone munito di collo a smeriglio in cui si inserisce un refrigeratore a serpentina collegato ad una presa d'acqua. Quando il campione giunge alla temperatura di ebollizione, il vapore, salendo nel refrigeratore, si condensa e viene a rifluire nel pallone. Il materiale insolubile viene filtrato su carta da filtro precedentemente pesata.
Spesso può essere necessario per alcuni campioni vegetali rimuovere le proteine prima di procedere alla determinazione della lignina. Questo può essere ottenuto trattando 100 mg di materiale lignocellulosico con 4 mL di soluzione di pepsina (1% in HCl 0,1 N) a +40° C per 20 h.

8.2. Determinazione della lignina insolubile (Li)
Il materiale insolubile viene lavato ripetutamente con acqua bollente per rimuovere ogni traccia di acido. Il filtro con la lignina di Klason viene essiccato in stufa a +105°C sino a peso costante.
La lignina acido-insolubile viene calcolata:

$$Li(\%) = | P_{(2)}\ (1-C(\%)/P_{(1)}|x100$$

dove Li(%) rappresenta la percentuale in peso della lignina insolubile, P(1) il peso secco del materiale in esame (g), C(%) il peso in percentuale delle ceneri e P(2) il peso del residuo insolubile in H_2SO_4 (g).

8.3. Determinazione delle ceneri (C)
Su una aliquota conosciuta (100-200 mg) del residuo secco ottenuto dopo idrolisi con H_2SO_4 vengono determinate le ceneri per combustione a +750°C in una atmosfera di ossigeno. Una volta accertato che si è ottenuta una completa ossidazione del materiale organico si determina il peso del residuo inorganico (C).
Determinazione della lignina solubile (Ls). Il filtrato ottenuto dopo idrolisi viene portato a volume in un matraccio da 50 mL con acqua distillata, quindi diluito 1:6 e analizzato spettrofotometricamente in cuvette di quarzo da 1 cm a 205 nm, usando come bianco H_2SO_4 al 72% diluito come un normale campione. La lignina acido solubile (%), noto il valore medio del coefficiente di estinzione corrispondente (110 l/g cm a 205 nm), viene calcolata:

$$Ls\ (\%) = A_{205}/_{110}\ x\ 6x50/1000\ x\ 100/P_{(1)}$$

dove Ls rappresenta il contenuto percentuale di lignina solubile, A_{205} l'assorbanza a 205 nm, 110 il coefficiente di estinzione corrispondente, $P_{(1)}$ il peso in grammi del materiale in esame.

8.4. Determinazione del contenuto totale di lignina (Lt)
Il contenuto totale in percento del peso del materiale in esame sarà dato da:

$$Lt\ (\%) = Li + Ls$$

dove Lt rappresenta il contenuto totale di lignina, Li il contenuto di lignina insolubile e Ls il contenuto di lignina solubile.

8.5. Determinazione spettrofotometrica della lignina
La determinazione spettrofotometrica della lignina negli estratti in diossano, acqua e acido cloridrico è basata sull'assorbimento delle unità aromatiche nell'ultravioletto (Janshekar et al., 1981; Johansson et al., 1986). Il diossano è un solvente che non contiene gruppi chimicamente reattivi e il massimo di assorbanza delle soluzioni di lignine di differenti materiali vegetali si ha a 280 nm. I carboidrati e le proteine non mostrano assorbimento nello spettro di assorbimento della lignina e quindi la loro presenza non interferisce nelle letture spettrofotometriche.
I campioni (100 mg) vengono estratti a temperatura ambiente per 48 h con 10 mL di solvente (HCl 0,2N in una soluzione 9:1 di diossano e acqua) che deve essere preparato fresco prima dell'uso. Si filtra ed il filtrato viene diluito 1:50 con il solvente. L'assorbanza della soluzione viene letta a 280 nm in una cuvetta di quarzo usando il solvente come bianco. Una curva di taratura può essere preparata usando diverse quantità di materiale, estraendole e misurando l'assorbanza a 280 nm.

8.6. Osservazioni
Entrambi i metodi forniscono stime quantitative e riproducibili della lignina ma presentano alcuni inconvenienti che non debbono essere sottovalutati, specialmente negli studi di degradazione di materiali lignocellulosici naturali. La determinazione della lignina di Klason fornisce spesso valori più alti di quelli reali perché le sostanze umiche prodotte durante la decomposizione vengono incluse nelle frazioni della lignina. Inoltre la quantità di lignina solubile aumenta durante la degradazione.
Il metodo spettrofotometrico, d'altro canto, fornisce solo stime relative e non assolute dato che non si possono usare molecole standard di riferimento e che differenti lignine danno differenti reazioni colorate. I vantaggi del secondo metodo rispetto alla determinazione della lignina di Klason consistono nel fatto che sono necessari solo piccoli quantitativi del campione e che il contenuto totale di lignina può essere determinato con una unica analisi.

9. Determinazione dell'attività ligninolitica mediante coloranti polimerici (Glenn e Gold, 1983)
I metodi usati per determinare la degradazione della lignina, siano essi basati sui metodi chimici che sull'uso di lignine marcate, sono generalmente complessi e richiedono tempi lunghi. Spesso però è necessario effettuare screenings veloci specialmente se si vuole valutare l'attività ligninolitica di campioni di suolo o di colture fungine. Un metodo basato sulla decolorazione di coloranti polimerici è stato proposto da Glenn e Gold (1983) per valutare la degradazione della lignina da parte del fungo *Phanerochaete*.
Questo metodo è stato applicato finora a colture pure di funghi ma può anche essere adottato negli studi di campioni naturali. La tecnica descritta utilizza il colorante poly B-411 per una stima del MPN di organismi ligninolitici di un campione di suolo.

9.1. Terreno colturale (Haider e Trojanowski, 1975)

Glucosio	5,0 g
Estratto di lievito	0,5 g
$NaNO_3$	3,0 g
KH_2PO_4	1,0 g
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	0,5 g
KCl	0,5 g
$FeSO_4 \bullet 7H_2O$	0,01 g
$Mn(CH_3COO)_2 \bullet 4H_2O$	0,008 g
$Zn(NO_3)_2$	0,002 g
$Ca(NO_3)_2 \bullet 4H_2O$	0,005 g
$CuSO_4 \bullet 5H_20$	0,003 g
Acqua deionizzata	1 L

9.2. Procedura consigliata

Al terreno di coltura sterilizzato in autoclave a +120°C per 20 minuti viene aggiunto lo 0,02% di Poly B-411 (polivinilammina sulfonato antrachinone) dopo averlo sterilizzato per filtrazione. Inoculare le sospensioni-diluizioni di suolo opportune in beutine da 100 mL contenenti 20 mL del terreno di coltura, 5 beutine per diluizione, e incubare in un agitatore orbitale a +30°C per 2-3 settimane. Ogni 3 giorni pesare le beutine e aggiungere la quantità di acqua sterile necessaria per compensare le perdite dovute all'evaporazione.

9.3. Risultati

Dopo 7, 15, 21 giorni prelevare da ogni beuta 1 mL del brodo colturale e centrifugare in una microcentrifuga per 5 minuti. Prelevare 0,1 mL del supernatante e diluire 1:10 con acqua. Determinare l'assorbanza a 593 e 483 nm e calcolare il rapporto tra le due assorbanze. Le diluizioni che mostreranno una diminuzione del rapporto A_{593}/A_{483} rispetto ai controlli non inoculati saranno considerate positive. Utilizzare le tabelle MPN per calcolare il numero dei microrganismi e riferirlo al peso secco dei campioni di suolo.

9.4. Osservazioni

È considerato un valido metodo indiretto per una valutazione veloce dell'attività ligninolitica. I coloranti polimerici non sono costosi, sono stabili e facilmente solubili, rimangono fuori della cellula e non sono tossici. I risultati di numerosi esperimenti hanno dimostrato che solo i funghi ligninolitici sono in grado di decolorare i coloranti polimerici e che l'efficienza di decolorazione è strettamente correlata all'abilità di degradare molti modelli di lignina (Gold et al., 1988). Infine, sembra evidente che i coloranti fungano da substrato per l'intero sistema degradativo fungino e che la loro degradazione sia influenzata dagli stessi fattori che influenzano la degradazione della lignina (Gold et al., 1988).

10. Bibliografia

Demain A.L., Solomon N.A. (1986), *Manual of industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society Microbiology.

Effland M.J. (1977), *Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp.* Tappi, 60, 143-144.

Glenn J.K., Gold M.H. (1983), *Decolorization of several polimeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium.* Appl. Environ. Microbiol., 45, 1741-1747.

Gold M.H., Glenn J.K., Alic M. (1988), *Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays*. Methods Enzymol., 161, 74-79.

Haider K., Trojanowski J. (1975), *Decomposition of specifically ^{14}C-labelled phenols and dehydropolymers of coniferyl alcohol as models for lignin degradation by soft and white rot fungi*. Arch. microbiol., 105, 33-41.

Hankin L., Anagnostakis S.L. (1977), *Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of microorganisms*.J. Gen. Microbiol., 98, 109-115.

Hankin L., Anagnostakis S.L. (1975), *The use of solid media for detection of enzyme production by fungi*. Mycologia, 47, 597-607.

Hankin L., Zucker M., Sands D.C. (1971), *Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria*. Appl. Microbiol., 22, 205- 209.

Janshekar H., Brown C., Fiechter A. (1981), *Determination of biodegraded lignin by ultraviolet spectrometry*. Analytica Chimica Acta., 130, 81-91.

Johansson M.B., Kogel I., Zech W. (1986), *Changes in the lignin fraction of spruce and pine needle litter during decomposition as studied by some chemical methods*. Soil Biol. Biochem., 18, 611-619.

Kluepfel D. (1988), *Screening of procaryotes for cellulose-and hemicellulose degrading enzymes*. Methods Enzymol., 160, 180-186.

Moore R.L., Basset B.B. and Swift M.J. (1979), Developments in the Remazol Brilliant Blue dye-assay for studying the ecology of cellulose decomposition. Soil Biol. Biochem., 11, 311-312.

Musha Y. and Goring D.A.I. (1974), *Klason and acid-soluble lignin content of hardwoods* .Wood Sci., 7, 133-134.

Pochon J. (1954), *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*. Masson e C. ed. Paris.

Poincelot R. P. and Day P.R. (1972), *Simple dye release assay for determining cellulolytic activity of fungi* Appl. Microbiol., 23, 875-879.

Tansey M.R. (1971), *Agar diffusion assay of cellulolytic ability of termophilic fungi*. Arch. fur Mikrobiologie, 77, 1-11.

Wollum A.G. (1982), in: Methods in soil analysis Part 2. Chemical and microbiological properties. Agronomy Monograph n. 9. ASA-SSSA, U.S.A.

Metodo III.9

CICLO DELLO ZOLFO

1. Introduzione

Lo zolfo è un elemento essenziale per la vita sulla terra. Esso viene costantemente convertito e trasformato tra i vari comparti organici dell'ambiente.
L'elemento esiste in natura in diverse forme, di queste, le seguenti sono quelle più importanti: la forma più ossidata SO_4^{2-}, la più ridotta S^{2-} (di cui le forme idrogeno solforato o solfuro di ferro sono quelle principalmente rappresentate) e la forma intermedia come S^0.
La conversione dello zolfo da uno stato all'altro è condotta principalmente dai microrganismi, la cui classificazione si basa sul tipo di reazione effettuata.

2. Solfo ossidanti

I microrganismi solfo ossidanti usano H_2S, zolfo elementare o altri composti parzialmente ridotti, convertendoli tutti a solfato SO_4^{2-}. Un membro del gruppo, il *Thiobacillus ferrooxidans*, può utilizzare anche il Fe_2^+ come fonte di energia.

2.1. Stima del MPN secondo Pochon (1954)

Si semina utilizzando sospensioni di suolo in un mezzo liquido minerale arricchito, dove lo zolfo è aggiunto come solfuro o come atmosfera arricchita di H_2S.
È un metodo piuttosto superato ed impreciso (non rileva il gruppo degli eterotrofi); permette comunque un primo dato orientativo.

2.2. Preparazione del mezzo base

K_2HPO_4	0,25	g
$MgCl_2$	0,10	g
NaCl	0,1	g
NH_4NO_3	2,0	g
$CaCO_3$	5,0	g
H_2O distillata	1	L

Ripartire il terreno liquido in tubi da saggio da 22 mL, in ragione di 5 mL per tubo, tappare con cotone, sterilizzare in autoclave per 20 minuti a +110°C.
Per la semina, utilizzare sospensioni diluite del campione secondo la tecnica standard della diluizione decimale, distribuire 1 mL per tubo (3 o 5 tubi per diluizione), utilizzare fino alla diluizione 10-5 come massimo.
a) Ossidazione dei solfuri: porre i tubi sotto campana contenente una capsula in cui è stato versato qualche mL di una soluzione fresca al 10% di monosolfuro di sodio (Na_2S) e quindi si incuba a +28°C.
b) Ossidazione dello zolfo: aggiungere asetticamente in ogni tubo 50 mg di fiori di zolfo (FS^0) previamente lavato e sterilizzato a +121°C per 15 minuti. Incubare a +28°C.

2.3. Lettura dei risultati

Dopo tre settimane, prelevare da ogni tubo, senza agitare, 1-2 mL di liquido e trasferirli in un tubo da saggio, aggiungere 2 gocce di HCl più 5 gocce di una soluzione acquosa di $BaCl_2$ al 5%.
La presenza di solfato si traduce in un precipitato lucido biancastro; confrontare con un testimone non inoculato.

3. Determinazione dei chemiolitotrofi

Conta del MPN di solfo ossidanti chemiolitotrofi obbligati secondo il metodo di Germida (1985), modificato da Chapman (1990).

3.1. Principio del metodo
Il MPN viene determinato in vaschette per analisi sierologiche (24-Well microtrite dishes) dove al mezzo vengono addizionati fiori di zolfo (FS^0) ed un indicatore che metta in evidenza la variazione del pH in seguito alla ossidazione dello zolfo.

3.2. Preparazione del campione
Dieci grammi di campione vengono trattati con 100 mL di H_2O sterile e sferette di vetro e quindi si agita per 10 minuti prima delle opportune diluizioni.

3.3. Composizione del mezzo

$(NH_4)_2SO_4$	0,20	g
$MgSO_4 \bullet H_2O$	0,50	g
$CaCl_2$	0,25	g
KH_2PO_4	3,0	g
$FeSO_4$	0,005	g
H_2O di rubinetto	1	L

Per la determinazione degli acidofili aggiungere al mezzo del blu di bromofenolo come indicatore allo 0,005% (pH 4,6 - 3,0), oppure verde bromocresolo allo 0,005% (pH 5,8 - 3,4), mentre per i neutrofili si deve aggiungere blu bromotimolo allo 0,003% (pH 7,0 - 6,0).
Si sterilizza in corrente di vapore per 30 minuti per tre giorni consecutivi.
Il mezzo può essere usato anche agarizzato al 2%.
I fiori di zolfo, vengono lavati tre volte in H_2O distillata, risospesi sempre in H_2O distillata (approssimativamente 50-60% p/v), e sterilizzati in autoclave per 15 minuti a +121°C. Dopo la sterilizzazione si hanno alcune aggregazioni di zolfo intorno alle pareti che devono essere rimosse; quindi si procede alla determinazione del peso secco dello zolfo.
Lo zolfo viene aggiunto al mezzo fino a raggiungere la concentrazione finale compresa tra 0,1 e 1%.
Ogni serie di pozzetti (3 o 5) viene riempita con 2,5 mL di mezzo. Si inocula con aliquote di 0,1 mL di appropriate diluizioni di campione; si incuba a +27°C. Una tesi senza zolfo viene usata come controllo per la valutazione dei microrganismi produttori di acido non solfo-ossidanti.
Il risultato viene preso come positivo quando il pH scende a valori compresi tra 5,0 e 2,8 e persino minori per gli acidofili, tra i quali possiamo includere *T. thiooxidans* e *T. ferrooxidans*. Mentre per i tiobacilli neutrofili, (p. es. *T. thioparus*, *T. neapolitanus* e *T. denitrificans*), si prende come positivo il risultato quando il pH oscilla tra valori 7,5 e 6,0.

4. Determinazione del MPN dei chemioeterotrofi
Il principio del metodo e la preparazione del campione è quella riportata per la determinazione dei chemiolitotrofi.

4.1. Mezzo di crescita

NH_4Cl	1,0	g
$MgCl_2$	0,5	g
$MgSO_4$	0,30	g
KH_2PO_4	0,40	g
K_2HPO_4	0,60	g
$FeCl_3$	0,02	g

$Na_2S_2O_3$	10,0	g
Blu bromotimolo	0,03	g
Soluzione di metalli pesanti*	30	mL
Estratto di lievito	5,0	g
H_2O distillata	1	L
pH 6,8		

*Soluzione metalli pesanti:

EDTA	1,5	g
Soluzione di Hoagland modificata**	6,0	mL
$FeSO_4 \bullet 7H_2O$	0,20	g
$ZnSO_4 \bullet 7H_2O$	0,10	g
$MnCl_2 \bullet 4H_2O$	0,02	g
H_2O distillata	1	L

**Soluzione di Hoagland modificata:

$AlCl_3$	1,0	g
KI	0,50	g
KBr	0,50	g
LiCl	0,50	g
$MnCl_2 \bullet 4H_2O$	7,0	g
H_3BO_3	11,0	g
$ZnCl_2$	1,0	g
$CuCl_2$	1,0	g
$NiCl_2$	1,0	g
$CoCl_2$	1,0	g
$SnCl_2 \bullet 2H_2O$	0,5	g
$BaCl_2$	0,5	g
Na_2MoO_4	0,5	g
$NaVaO_3 \bullet H_2O$	0,1	g
H_2O distillata	1	L

Ogni sale viene disciolto separatamente in H_2O distillata prima della miscelazione; ogni soluzione viene aggiustata a pH 7,0 mentre il pH della soluzione finale viene portato a pH 3-4. Prima dell'uso si deve agitare vigorosamente la soluzione.
I contenitori con i pozzetti vengono posti in camere umide ed incubati a +25°C per 60 giorni. Dopo 30 giorni si possono leggere i risultati che vanno poi confrontati con quelli determinati dopo 60 giorni.
La conta del MPN può essere calcolata usando anche un basic program (Hurley and Roscoe, 1983).

5. Determinazione del MPN dei chemiofototrofi
Si usa un mezzo che permette la crescita di tutti i solfobatteri fotosintetici, e che è stato descritto da Pfenning (1966) e modificato da Van Niel (1971).
Preparazione del mezzo in una quantità necessaria a riempire 30 bottiglie della capacità di 100 mL.

5.1. Soluzione 1

$CaCl_2 \bullet 2H_2O$	0,83	g
H_2O	2,50	mL

Per organismi alofili usare acqua di mare.

5.2. Soluzione 2

KH_2PO_4	1,0	g
NH_4Cl	1,0	g
$MgCl_2 \bullet 2H_2O$	1,0	g
KCl	1,0	g
Soluz. Vit. B_{12}*	3,0	mL
Soluz. metalli pesanti**	30,0	mL
H_2O distillata	67,0	mL

*2 mg di Vitamina B_{12} (cianocobalamina) sciolti in 10 mL di H_2O. La soluzione stock deve essere mantenuta al buio per prevenire la fotodecomposizione della vitamina.

***Soluzione metalli pesanti:

EDTA sale sodico	500,0	mg
$FeSO_4 \bullet 7H_2O$	200,0	mg
$ZnSO_4 \bullet 7H_2O$	10,0	mg
$MnCl_2 \bullet 4H_2O$	3,0	mg
H_3BO_3	30,0	mg
$CoCl_2 \bullet 6H_2O$	20,0	mg
$CuCl_2 \bullet 2H_2O$	1,0	mg
$NiCl_2 \bullet 6H_2O$	2,0	mg
$NaMoO_4 \bullet 2H_2O$	3,0	mg
H_2O distillata	1	L

Si solubilizza l'EDTA in acqua distillata a parte, quindi si aggiungono i sali alla soluzione che viene portata a 1 L; il pH finale viene aggiustato a circa 3,0.

5.3. Soluzione 3

Na_2CO_3	3,0	g
H_2O	900	mL

La soluzione viene sterilizzata in autoclave in un contenitore tappato con cotone in cui viene inserito un tubicino per una successiva gasificazione con CO_2 per 30 minuti.

5.4. Soluzione 4

Na_2S	3,0	g
H_2O distillata	200	mL

Questa soluzione viene sterilizzata in una bottiglia contenente una ancoretta magnetica.
La Soluzione 1 (2 L) viene distribuita in ragione di 67 mL in bottiglie con tappo a vite della capacità di 100 mL. Quindi si sterilizza in autoclave come tutte le altre soluzioni.
Tutte le soluzioni una volta tolte dall'autoclave devono essere raffreddate velocemente a bagnomaria per diminuire gli scambi con l'aria.
La Soluzione 3, dopo averla saturata con CO_2, viene addizionata alla Soluzione 2 e 33 mL di questa nuova soluzione vengono aggiunti asetticamente nelle bottiglie contenenti la Soluzione 1.
La bottiglia con la Soluzione 4 è posta su di un agitatore magnetico e il suo contenuto viene neutralizzato con circa 1,5 mL di H_2SO_4 2M sterile; 5 mL di questa soluzione vengono addizionati ad ognuna delle bottiglie contenenti il mezzo base.

Le bottiglie vengono quasi riempite con il rimanente della Soluzione 1 (500 mL), fino a lasciare una bolla di aria tra la superficie del liquido ed il tappo ed immediatamente chiuse. Il pH finale è compreso tra 6,7 e 7,2.
Il mezzo fresco subisce un intorbidamento in seguito all'ossidazione di alcuni solfuri a zolfo dovuto all'ossigeno disciolto; dopo alcuni giorni il mezzo si chiarifica per sedimentazione. Il mezzo fresco non deve essere utilizzato prima di 24 ore e si può conservare per alcuni mesi.
Le colture vengono incubate a +20-25°C vicino ad una lampada da 40 Watt (la distanza dalla sorgente luminosa è compresa tra 30 e 40 cm). Sono favorevoli fotoperiodi di 16 ore di luce e 8 ore di buio.
Se in seguito alla crescita dei microrganismi è stato utilizzato l'H2S e lo zolfo (scomparsa del sedimento) si deve aggiungere una soluzione fresca neutralizzata di Na_2S con le stesse modalità riportate in precedenza.
Il grado di crescita di un batterio fotosintetico è una funzione della sua attività (fotosintetica), e quindi entro certi limiti da l'ammontare dell'energia radiante assorbita dai suoi cloroplasti. Esponendo perciò la coltura a radiazioni di una lunghezza d'onda corrispondente all'assorbimento massimo di una particolare clorofilla (che è tipica per ogni genere di batterio fotosintetico) questa può agire come un potente agente selettivo e porta ad una predominanza di un singolo organismo in colture che in origine erano state inoculate con una popolazione mista.
Questo, associato a differenti temperature di crescita e tolleranza all'H_2S, permette una sufficiente selettività relativa alle Chlorobacteriaceae (*Chlorobiaceae*) e alle Thiorhodaceae (*Chromatiaceae*) rispettivamente.
Per i dettagli relativi alle lunghezze d'onda ed alla modulazione di alcuni componenti del substrato base si consiglia la consultazione del vol. XXIII di Methods in Enzymology.

6. Solfo riducenti
Il metabolismo dei solfo-riducenti si basa sulla riduzione dell'SO_4^{2-} o di altri composti inorganici dello zolfo come: solfiti, tiosolfati, tetrationati e S colloidale.

6.1. Stima dell'MPN
Il mezzo di Skerrman (1967) e una modificazione del mezzo di Starkey costituiscono un buon substrato per colture di arricchimento e per la conta del MPN da campioni provenienti da ambienti naturali.

6.2. Metodo
Il campione, una volta raccolto, viene posto in piastre Petri di vetro ed incubato per 2 giorni a +30°C in camere per anaerobiosi; dopo tale periodo un sub-campione viene inoculato direttamente nel mezzo, il quale sarà contenuto in bottiglie di vetro con tappo a vite a tenuta. Questo pretrattamento si può trascurare nel caso di campioni che si presumono ricchi di solfobatteri. In tal caso si passa direttamente all'inoculo del mezzo o nel caso di stima del MPN alle diluizioni decimali.

6.3. Lettura dei risultati
La colorazione nera del mezzo, dopo 7 giorni di incubazione a +30°C è indice di una attiva riduzione dei solfati.

6.4. Composizione del mezzo

K_2HPO_4	0,5	g
NH_4Cl	1,0	g
$CaSO_4$	1,0	g
Sodio lattato (70%)	2,0	mL
H_2O rubinetto	1	L

Sciogliere i sali, aggiustare il pH a 7,0 – 7,5 e sterilizzare a +121°C per 20 minuti.
Preparare separatamente una soluzione di $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \bullet 6H_2O$ all'1% e sterilizzare al vapore per 1 ora per tre giorni consecutivi. Aggiungere 5 mL del supernatante per 100 mL di mezzo sopra descritto immediatamente prima dell'uso.
Nota: questo mezzo ha un pesante precipitato ma è ben appropriato per colture grezze.
In alternativa un substrato di più rapida preparazione è quello descritto nel prossimo paragrafo:

6.5. Composizione del mezzo

K_2HPO_4	0,5	g
NH_4Cl	1,0	g
Na_2SO_4	1,0	g
$CaCl_2 \bullet 2H_2O$	0,1	g
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	2,0	g
Sodio lattato (70%)	5,0	mL
H_2O distillata	1	L

Far sciogliere gli ingredienti ed aggiustare il pH a 7,0-7,5. Sterilizzare a +121°C per 20 minuti.
Nota: questo mezzo ha un debole precipitato, che può essere rimosso per filtrazione, e successivamente deve essere risterilizzato.
Preparare una soluzione di $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \bullet 6H_2O$ all'1% come per il mezzo di Skerrman, e aggiungere 5 mL per ogni 100 mL di mezzo immediatamente prima dell'uso.
Per i ceppi alofili, addizionare 1-3% di NaCl ad ogni mezzo prima della sterilizzazione o alternativamente rimpiazzare l'acqua distillata con acqua di mare.

7. Isolamento e mantenimento delle colture

I mezzi descritti sopra non sono ideali per studi in coltura pura. Skerrman raccomanda il seguente mezzo, descritto da Butlin e Coll. (1949) e modificato da Postgate (1963). Il mezzo è simile per molti aspetti a quello pubblicato indipendentemente da Miller (1950).

7.1. Composizione del mezzo

K_2HPO_4	0,5	g
NH_4Cl	1,0	g
Na_2SO_4	1,0	g
$CaCl_2 \bullet 6H_2O$	0,1	g
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	2,0	g
Na-lattato (70%) steriliz. a parte	3,5	mL
Estratto di lievito	1,0	g
$FeSO_4 \bullet 7H_2O$	0,02	g
H_2O distillata	1	L

Sciogliere gli ingredienti, aggiustare il pH a 7,5 e autoclavare per 20 minuti a +121°C. Filtrare via il sedimento, distribuire come richiesto per la determinazione del MPN e risterilizzare.
Preparare separatamente una soluzione di cisteina cloridrato allo 0,6% in acqua distillata e sterilizzare a +121°C per 20 minuti. Questa soluzione ha un pH di 1,8 ed è relativamente stabile all'ossidazione, per cui non è necessario neutralizzare; 9 mL di mezzo vengono addizionati di 1 mL di detta soluzione immediatamente prima dell'uso. Quindi si incuba in condizioni aerobiche.
Ad un esame microscopico le colonie nel mezzo liquido, appaiono nere ed appuntite.
Se si desidera, le colture possono essere piastrate sullo stesso mezzo contenente 2% di agar ed incubate anaerobicamente in atmosfera di idrogeno e 5% di anidride carbonica.

In alternativa al mezzo sopra descritto, se non si dispone di una camera di anaerobiosi, può essere usato il seguente substrato sempre suggerito da Postgate (1963):

KH_2PO_4	0,6	g
NH_4Cl	1,0	g
Na_2SO_4	1,0	g
$CaCl_2 \bullet 6H_2O$	1,0	g
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	1,0	g
Na-lattato	3,5	g
Estratto di lievito	1,0	g
Ac. ascorbico	0,1	g
Ac. tioglicolico	0,1	g
$FeSO_4 \bullet 7H_2O$	0,5	g
Agar	15,0	g
H_2O distillata	1	L

Nel caso di ricerca di microrganismi alofili aggiungere 10 g/L di NaCl.
Portare a pH 7,6 con NaOH, autoclavare per 15 minuti ad una pressione di 1 atm e ad una temperatura di +40-44°C, versare asetticamente 10 mL di mezzo nei tubi di semina ed aggiungere 1 mL del campione da saggiare. Mescolare, lasciar solidificare e quindi sigillare con un tappo di agar (circa 1,5 cm) per prevenire il contatto con l'aria della porzione inoculata. Si incuba a +28°C fino a che il numero delle colonie nere (batteri solfo-riduttori) rimane costante (da 3 a 16 giorni).

8. Bibliografia
Butlin K.R., Adams M.E, Thomas M. (1949), J. Gen. Mycrobiol., 3, 46.
Chapman S.J. (1990), Soil. Biol. Biochem., 22, n° 4, 479.
Germida J.J. (1985), In: Planetary Ecology (D.E. Caldwell, J.A. Brierly & C.L. Brierly, Eds), p. 333.
Hurley M.A., Roscoe M.E. (1983), J. Appl. Bacteriol., 55, 159.
Miller L.P. (1950), Contr. Boyce Thompson Inst. Pl. Res., 6, n° 3, 83.
Pochon J. (1954), In: Manual thecnique d'analyse microbiologique du sol. (Nasson e C. Eds.) Paris.
Postgate J.R. (1963), - Appl. Microbiol., 11, 265.
Pfenning N., Lippert K.D. (1966), Arkiv fur Mikrobiol., 55, 245.
Skerrman V.B.D. (1967), In: A guide to the identification of the genera of bacterial (Williams & Wilkins Eds) Baltimore.
Van Niel C.B. (1971), In: Methods in Enzymology XXIII, 3. Accademic Press.

IV - DETERMINAZIONE MICORRIZE ARBUSCOLARI, METANOBATTERI, MICROFLORA FOTOSINTETICA OSSIGENASICA

Metodo IV.1

MICROFLORA FOTOSINTETICA OSSIGENICA

1. Introduzione

I cianobatteri e le microalghe eucariote, microrganismi autotrofi provvisti di clorofilla e in grado di svolgere la fotosintesi ossigenica, sono componenti ubiquitari delle comunità microbiche che si sviluppano sulla superficie del suolo in ecosistemi aridi ed umidi a tutte le latitudini.
La microflora fotosintetica ossigenica del suolo comprende più frequentemente cianobatteri (alghe verdi-azzurre), Cloroficee (alghe verdi), Xantoficee (alghe gialle) e Bacillarioficee (diatomee), ma possono essere presenti anche Euglenoficee (euglenoidi) e Rodoficee (alghe rosse).
Le microalghe ed i cianobatteri del suolo, in quanto componenti normali della microflora tellurica, possono rappresentare dei validi monitori microbiologici dell'inquinamento del suolo da fitofarmaci, e in particolar modo da diserbanti. Come le piante infestanti, microalghe e cianobatteri per la loro localizzazione superficiale sono infatti particolamente esposti all'azione di tali composti, i quali possono determinare profonde modificazioni nella composizione della popolazione.

2. Metodi di valutazione quantitativa

Vengono riportati i metodi diretti, rappresentati dalla conta totale (1.2.1.) e dalla conta vitale (1.2.2. e 1.2.3.), ed il metodo indiretto basato sulla determinazione del contenuto in clorofilla *a* del suolo (1.2.4.).
Per distinguere i differenti componenti della microflora fotosintetica ossigenica occorre effettuare delle osservazioni al microscopio. Microalghe e cianobatteri sono facilmente distinguibili fra di loro: nelle prime, che sono microrganismi eucarioti, i pigmenti sono contenuti in plastidi mentre nei cianobatteri, organismi procarioti, i pigmenti appaiono uniformemente diffusi nella cellula. Le più comuni microalghe del suolo sono le alghe verdi con pigmentazione dal verde al verde giallastro e le diatomee aventi parete cellulare rigida silicizzata e pigmentazione dal bruno al verde chiaro. I cianobatteri, caratterizzati da pigmentazione verde azzurra o verde bruna, sono presenti nel suolo sia con generi unicellulari che filamentosi, questi ultimi comprendenti molti organismi azotofissatori. Per un eventuale riconoscimento a livello di genere nell'ambito dei diversi raggruppamenti, si consiglia la consultazione di opere specifiche (Bold e Wynne, 1985).

2.1. Conta totale al microscopio ottico

2.1.1. Materiali

Pipette graduate
Beuta Sovirel da 250 mL
Palline di vetro del diametro di 2-5 mm
H_2O sterile
Camera contaglobuli di Thoma (Superficie complessiva del reticolo 1 mm^2, profondità 0,1 mm. Reticolo composto da 16 gruppi di quadrati; ogni gruppo è a sua volta suddiviso in 16 quadratini di 0,05 mm di lato).
Microscopio ottico

2.1.2. Procedura consigliata
Mettere 10 g del campione di suolo nella beuta contenente alcune palline di vetro (una ventina circa), aggiungere 90 mL di H_2O sterile e agitare fino ad ottenimento di una sospensione omogenea. Introdurre una goccia della sospensione nella camera contaglobuli coperta dal relativo vetrino coprioggetto; contare le unità algali e/o cianobatteriche (cellule o corti filamenti) presenti in 5 gruppi di quadrati, corrispondenti cioè a 80 quadratini (volume complessivo pari a 0.02 mm^3). Moltiplicando il valore ottenuto per 5.10^4 e per il fattore di diluizione, si ottiene il numero di microrganismi presenti in 1 g del campione di suolo.

2.1.3. Osservazioni
Il metodo, adatto per campioni di acqua, è di più difficile applicazione per il suolo a causa dei detriti presenti. Può essere vantaggioso l'uso del microscopio a fluorescenza, mediante il quale si evidenziano le cellule pigmentate che sono naturalmente fluorescenti.

2.2. Conta vitale mediante semina in piastra

2.2.1. Materiali
Pipette graduate
Piastre Petri del diametro di 90-100 mm
Tubi contenenti 9 mL di H_2O
Tubi contenenti 20 mL del mezzo di coltura sotto riportato

2.2.2. Mezzo di coltura BG-11 (Rippka, 1988)
(composizione in mg L^{-1})
$NaNO_3$, 1500; $MgSO_4$ $7H_2O$, 75; K_2HPO_4 $3H_2O$, 40; $CaCl_2$ $2H_2O$, 36; Na_2CO_3, 20; acido citrico, 6; ferro (III)-ammonio citrato, 6; Na_2-EDTA, 1; soluzione di microelementi 1 mL; pH=7,4; agar 10 g.
Per i cianobatteri azotofissatori viene omessa la fonte di azoto (mezzo BG-11o).

2.2.3. Soluzione di microelementi (g L^{-1})
H_3BO_3, 2,86; $MnCl_2$ $4H_2O$, 1,81; $ZnSO_4$ $7H_2O$, 0,22; $CuSO_4.5H_2O$, 0,08; Na_2MoO_4 $2H_2O$, 0,39; $Co(NO_3)_2$ $6H_2O$, 0,049.
Per la conta delle microalghe eucariote aggiungere in piastra bacitracina (concentrazione finale, 15-30 mg L^{-1}); per la conta dei cianobatteri aggiungere cicloesimide (concentrazione finale, 20-100 mg L^{-1}) (Reynaud e Roger, 1977).

2.2.4. Procedura consigliata
Usare materiali sterili e lavorare in condizioni di asepsi. Sospendere il campione in acqua sterile come in 1.2.1.2 e preparare diluizioni decimali seriali fino a 10^{-6}.
Semina in profondità: inoculare 1 mL di campione in sospensione opportunamente diluita sul fondo della piastra (in triplo per ogni diluizione decimale seriale effettuata), aggiungere 40 mL di mezzo di coltura fuso e raffreddato a +45°C e mescolare accuratamente. Dopo solidificazione, capovolgere la piastra e porre ad incubare in opportune condizioni di luce e temperatura (20-30 µmoli di fotoni m^{-2} s^{-1} e +24°-30°C). Contare il numero di colonie sviluppate nelle piastre e scegliere le diluizioni in corrispondenza delle quali si ha un numero di colonie per piastra compreso fra 30 e 300. Moltiplicando il numero medio delle colonie per piastra per il fattore di diluizione corrispondente si ottiene il numero di organismi vivi per grammo di campione originario.
Semina in superficie: versare 40 mL di mezzo agarizzato fuso in piastra. Dopo solidificazione, prosciugare le piastre per 2 h a +37°C. Inoculare sulla superficie del mezzo agarizzato 0,1 mL di campione in sospensione opportunamente diluita. Distribuire omogeneamente l'inoculo utilizzando delle palline di vetro sterili, che vengono fatte ruotare sulla superficie inoculata. Capovolgere le piastre e rimuovere le palline di vetro. Dopo incubazione in opportune condizioni si procede a contare le

colonie sviluppate, calcolando il numero di microrganismi nel campione di suolo come precedentemente riportato.

2.2.5. Osservazioni

Il metodo, basandosi sull'abilità dei microrganismi presenti nel campione di crescere su mezzi colturali solidi, penalizza alcuni tipi strettamente legati ad ambienti idromorfi. Pertanto, non vi è la certezza che la microflora che si sviluppa nelle piastre abbia una composizione del tutto corrispondente a quella del campione in esame. Inoltre è difficile fare una stima degli organismi mobili che non formano colonie (tipo *Oscillatoria* spp.) e si deve anche tenere presente che, nel caso di organismi filamentosi, il numero delle colonie che si sviluppano è funzione del grado di frammentazione che si verifica durante la diluizione. Tuttavia questo metodo è il più seguito in quanto permette l'isolamento e la successiva identificazione delle specie presenti.

2.3. Conta vitale su mezzo liquido mediante determinazione del numero più probabile (MPN)

2.3.1. Materiali

Pipette graduate
Provette con 9 mL di H_2O
Provette contenenti 5 mL di mezzo colturale liquido BG-11 o BG-11° (Vedi 1.2.2.2.)
Microscopio ottico

2.3.2. Procedura consigliata

Sospendere il campione di suolo come al punto 1.2.1. Preparare delle diluizioni decimali seriali fino a 10^{-6}. Seminare 1 mL per ogni diluizione in triplo o in quintuplo nei tubi contenenti 5 mL di mezzo colturale selettivo. Incubare come riportato nel punto 1.2.2. per la semina in piastra mantenendo le provette inclinate per facilitare gli scambi gassosi. Dopo 21 giorni annotare per ciascuna diluizione il numero dei tubi positivi, presentanti cioè sviluppo microalgale o cianobatterico riconoscibile per la pigmentazione dal verde al bruno. Calcolare l'MPN, in base al grado di diluizione del campione di suolo, utilizzando le tavole di Mc Crady. Per determinare la quantità dei differenti componenti della microflora fotosintetica ossigenica mediante l'MPN occorre verificarne la presenza alle diverse diluizioni mediante osservazioni al microscopio.

2.3.3. Commenti

Il metodo è rapido ed idoneo per campioni contenenti un basso numero di organismi, per i quali il metodo della semina in piastra è meno indicato. Infatti, alle basse diluizioni, lo sviluppo di microalghe e cianobatteri su mezzo agarizzato facilmente viene ostacolato da quello della microflora eterotrofa a più rapida crescita.

2.4. Determinazione della clorofilla (Metodo di Hoyt, 1966, modificato)

2.4.1. Materiali

Beuta Sovirel da 100 mL
Acetone
Palloncini tarati
HCl 4N
$MgCO_3$

2.4.2. Procedura consigliata

Pesare 10-20 g di suolo, metterlo nella beuta e aggiungere 30 mL di acetone al 90% neutralizzato con $MgCO_3$. Tappare ermeticamente ed agitare per 5 h al buio, a +4°C. Centrifugare a 15000 x g per 15 minuti, decantare l'estratto acetonico e portarlo a volume in palloncino tarato. Misurare allo

spettrofotometro l'assorbimento (A) a 663 nm e a 750 nm. Ripetere la lettura dopo acidificazione con poche gocce di HCl 4N. Calcolare la quantità di clorofilla a (clo *a*) secondo la seguente formula:

*mg (clo a) per mL (estratto) = A corretto / 89**

A corretto = 2,43 [(A°663 - A°750) - (A°°663 - A°°750)]; A°, prima dell'acidificazione; A°°, dopo acidificazione;*, coefficiente di estinzione della clo *a*.
Riferire la quantità di clorofilla *a* grammo di suolo, moltiplicando il valore precedentemente trovato per il volume di estratto e dividendo il valore ottenuto per la quantità di suolo.

2.4.3. Commenti
Il metodo è poco indicato per suoli contenenti abbondanti residui vegetali, in quanto in essi sono presenti miscugli di vari pigmenti e prodotti della loro degradazione che possono interferire con la misura della clorofilla proveniente dalla microflora fotosintetica presente nel campione. Inoltre si deve tenere presente che il contenuto di clorofilla in un microrganismo fotoautotrofo può variare in relazione al suo stato fisiologico.

3. Tecniche di isolamento
L'isolamento delle specie cianobatteriche e microalgali presenti nel suolo viene effettuato direttamente mediante micromanipolatore o isolando le singole colonie sviluppatesi dalla semina in piastra, secondo quanto riportato al punto 1.2.2. Per suoli a bassa densità microalgale o per la ricerca di gruppi particolari (ad es. cianobatteri azotofissatori) può essere opportuno arricchire preliminarmente il campione sugli idonei mezzi colturali (1.2.2.2.).

3.1. Isolamento mediante micromanipolazione

3.1.1. Materiali
Pipette Pasteur capillari
Vetrini portaoggetto
Tubi con mezzo colturale
Micromanipolatore

3.1.2. Procedura consigliata
Usare materiali sterili e lavorare in condizioni di asepsi. Osservare al microscopio sospensioni diluite di suolo e prelevare con micropipette Pasteur le singole cellule o i brevi filamenti, trasferendoli in tubi contenenti il mezzo colturale.

4. Tecniche di arricchimento e isolamento delle colonie sviluppate in piastra

4.1. Materiali
Beute con 50-100 mL di mezzo colturale
Tubi con mezzo colturale liquido
Strisci di mezzo colturale
Piastre Petri
Spatola ed ansa

4.2. Procedura consigliata

Arricchimento del campione di suolo su mezzo liquido: distribuire 0,5-1,0 g di suolo in beute contenenti il mezzo colturale ed incubare come riportato al punto 1.2.2.2. fino all'ottenimento dello sviluppo microalgale.

Arricchimento diretto del campione di suolo: allestire delle piastre con 20 - 40 g di suolo, inumidirlo con 10-20 mL di H_2O sterile e molarlo in superficie con una spatola. Incubare come sopra riportato.

Isolamento: dalle colture di arricchimento su mezzo liquido, al fine di isolare le specie presenti, si procede alla semina in piastra sugli idonei mezzi colturali (1.2.2.2.). Le colonie sviluppatesi sulla superficie della terra molata vengono strisciate su mezzi agarizzati in piastra. Nel caso che le colture ottenute non siano monoalgali, ripetere l'operazione fino ad ottenere l'isolamento delle singole specie. I ceppi isolati vengono matenuti su mezzo BG-11 liquido o agarizzato (strisci), omettendo la fonte di azoto combinato per i cianobatteri azotofissatori (mezzo BG-11o).

5. Bibliografia

Bold H.C., Wynne M.J. (1985), *Introduction to the Algae. Structure and Reproduction*. Prentice-Hall, New Jersey, p. 720.

Hoyt P.B. (1966), *Chlorophyll-type compounds in soil and their origin*. Plant and Soil, 25, 167-171.

Rippka R. (1988), *Isolation and purification of cyanobacteria*. In Methods in Enzymology, Vol. 167 (L. Packer and A.N. Glazer, Eds), Academic Press, San Diego, pp. 3-27.

Reynaud P.A., Roger P.A. (1977), *Milieux selectifs pour la numeration des algues eucaryotes, procaryotes et fixatrices d'azote*. Revue d'Ecologie et Biologie du Sol, 14, 421-428.

Metodo IV.2

METANOBATTERI

1. Introduzione

I microrganismi strettamente anaerobi, quali i batteri metanogeni, richiedono assenza di ossigeno molecolare (O_2) ed un basso potenziale redox (E_h) nei mezzi di coltura.
Di seguito viene proposta la metodica orientata alla valutazione quantitativa dei metanobatteri che è in particolare adottabile qualora non necessiti l'isolamento delle singole forme microbiche.

1.1. Tecniche di coltivazione

In questa sede si riportano le procedure per la manipolazione dei batteri metanogeni secondo le più recenti acquisizioni che hanno preso le mosse dalle pionieristiche indicazioni di Hungate (1950), relative alla coltivazione di microrganismi anaerobi stretti.. Il metodo proposto si basa in particolare sui protocolli descritti da Balch e Wolfe (1976) e presuppone l'uso di tre componenti fondamentali: a) bottiglie o tubi con bocca adatta ad ospitare uno spesso tappo di butile nero fissato con una ghiera di alluminio; b) una camera di anaerobiosi; c) una centralina per dispensare gas o miscele di gas completamente prive di ossigeno.

1.2. Camera di anaerobiosi

Per la preparazione dei mezzi colturali e delle soluzioni anaerobiche, nonché per gli strisci su mezzi agarizzati in piastre Petri è indispensabile l'uso di una camera di anaerobiosi che, storicamente, in letteratura viene definita di tipo Freter (Aranki and Freter, 1972). Oggi, tuttavia, sono disponibili in commercio vari modelli di camera di anaerobiosi, proposti da diversi costruttori. In ogni caso, l'atmosfera interna è costituita da una miscela N_2:CO_2:H_2 nel rapporto 85:15:10. All'interno della camera l'idrogeno consente il funzionamento di un catalizzatore al palladio per la rimozione di eventuali tracce di ossigeno. $CaCl_2$ finemente macinato ovvero granuli di gel di silice rigenerabile vengono invece collocati in camera d'anaerobiosi per eliminare il vapor d'acqua che si libera specialmente durante le operazioni di distribuzione dei substrati agarizzati nelle piastre.

2. Conta in liquido dei metanobatteri

Il metodo si basa sulla valutazione indiretta dell'MPN impiegando terreni colturali di comune reperibilità quale ad esempio il Todd Hewitt Broth ed operando in condizioni di rigorosa anossia all'interno di una cabina anaerobica.

2.1. Preparazione del terreno colturale

Il terreno sopra indicato va addizionato di acetato e formiato di sodio entrambi allo 0.25% e deve essere portato a pH 7. La preparazione va effettuata in una cabina anaerobica impiegando acqua che sia stata preridotta per 24-48 h all'interno della stessa. Tutti gli altri componenti del terreno andranno introdotti in cabina almeno due ore prima dell'utilizzo. Il terreno verrà quindi distribuito in vial da 50 mL, ognuno riempito con 20 mL, chiusi poi con tappi di gomma butilica e ghiere di serraggio in alluminio.
I vial verranno poi estratti dalla cabina anaerobica per essere sottoposti a sterilizzazione a +115°C per 20 minuti.

2.2. Prelievo dei campioni

I suoli da campionare devono essere decorticati prima del prelievo che verrà eseguito per mezzo di un carotatore. Durante tale operazione si deve limitare per quanto possibile il contatto con l'aria,

operando nel più breve tempo e riponendo immediatamente i campioni in sacchetti di plastica successivamente sottoposti a lavaggio con atmosfera inerte, ad esempio mediante bombola di N_2, per eliminare l'ossigeno atmosferico.
Qualora il campione da prelevare si trovasse in suoli allagati (ad esempio risaie, o sedimenti di corpi idrici), il prelievo si effettuerà per mezzo di un contenitore che possa essere riempito completamente e chiuso in sommersione.
I campioni andranno poi riposti in un contenitore possibilmente refrigerato e trasportati nel più breve tempo possibile al laboratorio per essere messi in condizioni di anaerobiosi rigorosa come quella offerta dalle cabine anaerobiche. I campioni andranno utilizzati entro 24 h dal prelievo.

2.3. Semine ed incubazione

Operando all'interno di una cabina anaerobica, per ogni campione verrà allestita una serie di diluizioni-sospensioni in base 10 impiegando come medium diluente una soluzione salina preridotta quale la Dilution-blank indicata dal Virginia Polytechnic Institute (Holdeman and Moore, 1973).
Con ogni diluizione verranno inoculati, mediante siringa, tre vial (tecnica dell'MPN in triplo) poi estratti dalla cabina stessa. Lo spazio di testa di ciascun vial verrà lavato con una miscela di H_2-CO_2 (80/20 v/v) per mezzo di una siringa collegata direttamente ad una bombola di tale miscela; gli stessi vials verranno poi mandati in sovrapressione a circa 1-2 atm con tale miscela gassosa. Le temperature di incubazione saranno di +37°C nel caso si ricerchino metanobatteri mesofili, di +50/55°C nel caso si valutino metanobatteri termofili.

2.4. Letture

Dopo 10 giorni dalla semina si potrà effettuare la prima valutazione per verificare la presenza di metanobatteri. Sarà considerato positivo ogni vial nel quale sia rilevabile gascromatograficamente la presenza di metano e/o nel quale si possa constatare la presenza di microrganismi fluorescenti mediante l'osservazione di preparati a fresco al microscopio a fluorescenza. In caso di risultato negativo le letture andranno ripetute a 20 giorni.
Tale caratteristica fluorescenza del coenzima F_{420} andrà osservata con un microscopio ad epifluorescenza equipaggiato ad esempio con un set di filtri H 436 della Zeiss, con un filtro di eccitazione 436/8, partitore dicromatico FT 460 e filtro di sbarramento LP 470.
La valutazione gascromatografica del metano può essere effettuata impiegando un gascromatografo con detector a termoconducibilità e dotato di colonna a setacci molecolari (1m x 4 mm). Le condizioni operative saranno: iniettore +100°C, forno +40°C, carrier elio, flusso 20 mL/minuto.

3. Bibliografia

Aranki A., Freter R. (1972), *Use of anaerobic glove boxes for the cultivation of strictly anaerobic bacteria.* Am. J. Clin. Nutr., 25, 1329-1334.

Balch W.E., Wolfe R.S. (1976), *New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethansulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of Methanobacterium ruminantium in a pressurized atmosphere.* Appl. Environ. Microbiol., 32, 781-791.

Holdeman L.V., Moore W.E.C. (1973), *Anaerobic Laboratory Manual*, 2nd edn. Virginia Polytechnic Institute and State University Anaerobe Manual, Blacksburg, Virginia, USA.

Hungate R.E. (1950), *The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria.* Bacteriol. Rev., 14, 1-49.

Metodo IV.3

METODI DI STUDIO DELLE MICORRIZE ARBUSCOLARI NEL SUOLO

1. Introduzione

Le micorrize arbuscolari sono associazioni simbiontiche che si instaurano tra le radici della maggior parte delle piante (80%) e molte specie di funghi del suolo. La maggior parte delle piante agrarie possiede micorrize arbuscolari, ed i funghi interessati appartengono ad un ristretto gruppo di Zygomycetes, l'ordine Glomales. I metodi per la valutazione di tale simbiosi non sono assimilabili a quelli di conta generale microbica, poichè i funghi interessati sono biotrofi obbligati e non sono in grado di vivere separatemente dalla pianta ospite.

2. Principio

a) I metodi per la valutazione della infezione micorrizica si basano sulla colorazione differenziale delle radici (Clearing and staining technique, Phillips e Hayman, 1970), e sulla misura della percentuale di lunghezza radicale infetta (Gridline intersect method, Giovannetti e Mosse, 1980).
b) I metodi per la valutazione del numero di spore presenti nel suolo si basano sulla conta diretta dopo lavaggio e setacciamento del suolo (Wet-sieving and decanting technique, Gerdemann e Nicolson, 1963).
c) I metodi per la valutazione della infettività di un suolo si basano sulla determinazione del numero di propaguli infettivi presenti in un dato suolo (Most probable number technique, Porter, 1979).

3. Reagenti

Nel corso dell'analisi, le operazioni che prevedono l'uso di Trypan blu devono essere eseguite sotto una cappa aspirante. In ogni caso, il lattofenolo può essere sostituito con acido lattico.

a) Idrossido di potassio, KOH, soluzione 10% in acqua distillata.
b) Acido cloridrico, HCl, soluzione 2% in acqua.
c) Trypan blu, soluzione 0.05% in lattofenolo.
d) Acido lattico puro

4. Apparecchiatura

Corrente attrezzatura da laboratorio ed in particolare:
a) Bagno ad acqua con termostato.
b) Microscopio stereoscopico.
c) Provette di vetro.
d) Piastre Petri sulla cui base esterna sia stampata una griglia di linee perpendicolari tra loro.
e) Contatore manuale.
f) Serie di setacci metallici a maglie di diametro 700, 400, 250, 100, 50 µm.
g) Autoclave per la sterilizzazione del suolo.
h) Provette di plastica del volume di 50-100 mL, sulla cui base siano stati praticati alcuni piccoli fori;
i) Camera di crescita in condizioni controllate o serra.
j) Semi di specie di piante micotrofiche come trifoglio, medica, porro.

5. Procedura consigliata

5.1 Colorazione differenziale delle radici e determinazione della percentuale di lunghezza radicale infetta

a) Immergere un campione rappresentativo di radici o di segmenti radicali (2-5 g) in una provetta di vetro contenente KOH.
b) Porre la provetta contenente le radici in un bagnomaria, a +90°C, per un tempo variabile da 30 minuti ad 1 h, a seconda del diametro radicale.
c) Risciacquare il campione in acqua corrente e acidificarlo in HCl (3.2).
d) Aggiungere al campione radicale Trypan blu al lattofenolo, e porre la provetta in un bagnomaria a +90°C per 5 minuti.
e) Rimuovere l'eccesso di colorante, risciacquando il campione in acido lattico puro. Il campione può essere mantenuto per alcuni giorni in acido lattico e successivamente esaminato al microscopio stereoscopico per la stima quantitativa della infezione radicale.
f) Versare il campione in una piastra Petri su cui è disegnata una griglia di linee rette intersecantesi perpendicolarmente, distribuire le radici uniformemente sopra la griglia, e porre la piastra Petri sotto al microscopio stereoscopico (20-50 ingrandimenti).
g) Procedere al conteggio di tutti i punti in cui una linea retta della griglia interseca una radice, registrando mediante un contatore manuale la presenza o meno dell'infezione micorrizica nel punto individuato.

5.2. Valutazione del numero di spore presenti nel suolo

a) Sospendere un campione rappresentativo di un dato suolo, fresco e asciutto, di circa 100 g, in 1 l di acqua di rubinetto, in un beaker, agitando con un bastoncino di vetro, e lasciando quindi sedimentare per circa 20 secondi: in tal modo le particelle più pesanti sedimentano rapidamente.
b) Filtrare rapidamente attraverso i setacci a maglie di diametro decrescente a partire dall'alto, posti uno sull'altro.
c) Ripetere le operazioni a e b per tre volte.
d) Risospendere in poca acqua le frazioni organiche depositatesi su ciascun setaccio e versarle separatamente in piastre Petri per il successivo conteggio.
e) Contare il numero di spore presenti in ciascuna piastra. Allo scopo di facilitare il conteggio viene spesso utilizzata una piastra avente alla base cerchi in rilievo concentrici, adatta alla conta dei nematodi. Le spore sono facilmente riconoscibili dal loro notevole diametro (50-500 µm), dalla forma globosa e dal colore, che varia nelle diverse specie da bianco a giallo, rosa, rosso, marrone, nero.

5.3. Valutazione del numero di propaguli fungini

a) Preparare una serie di diluizioni decimali del suolo da saggiare utilizzando come diluente lo stesso tipo di suolo previamente sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti. Le diluizioni di suolo su cui eseguire le prove sono: 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}.
b) Riempire con le varie diluizioni di suolo le provette di plastica, effettuando 5 repliche.
c) Seminare ogni provetta con i semi delle specie di piante micotrofiche.
d) Far crescere le piantine per 6 settimane in camera di crescita o in serra.
e) Raccogliere le radici da ogni replica e diluizione, lavarle, chiarificarle e colorarle come precedentemente descritto, e determinare la presenza o assenza di infezione micorrizica in ogni apparato radicale.

6. Espressione dei risultati

6.1. Calcolo della percentuale di lunghezza radicale infetta
Il numero dei punti radicali in cui è presente l'infezione, diviso per il numero totale delle intersezioni tra radici e linee rette, moltiplicato per 100, darà la percentuale di lunghezza radicale infetta.
Se si avrà l'avvertenza di utilizzare una griglia con distanze tra le linee rette di 1.27 cm, il numero totale di intersezioni darà direttamente la lunghezza in cm del campione radicale studiato ed il numero di intersezioni in cui le radici sono positive all'infezione darà i cm di lunghezza radicale infetta del campione in esame (Newman, 1966; Marsh, 1971; Giovannetti e Mosse, 1980). Questo metodo di calcolo è basato sulla formula matematica di Newman (1966), che mette in relazione la lunghezza di linee curve disposte in una data area con il numero di volte che esse intersecano delle linee rette poste a caso nell'area occupata da esse:

$$R = \frac{M \times A \times n}{2H}$$

R=lunghezza totale delle radici;
A=area nella quale sono distribuite le radici;
n=numero di intersezioni tra le radici e le linee rette;
H=numero totale di linee rette.

Marsh (1971) considerò una serie regolare di linee tale da formare una griglia quadrata. Quando la distanza tra le linee era 14/11 della unità di misura richiesta, allora MA=2H, cioè la lunghezza radicale in cm era uguale al numero di intersezioni contate tra le radici stesse e le linee rette.

6.2. Calcolo del numero totale di spore
Il numero totale di spore contenute nel campione di 100 g di suolo si ottiene sommando i numeri relativi alle spore presenti nelle diverse piastre Petri su cui era stato versato il materiale organico depositato sui setacci metallici.

6.3. Calcolo del numero totale di propaguli fungini
Il numero dei propaguli fungini presenti nel campione di suolo si ottiene utilizzando le stesse tavole usate per la determinazione dei microrganismi del suolo secondo il metodo classico delle sospensioni/diluizioni (Cap. 2 del presente testo).

7. Bibliografia
Gerdemann J.W., Nicolson T.H. (1963), *Spores of endomycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting.* Transactions of the British Mycological Society, 46, 235-244.

Giovannetti M., Mosse B. (1980), *An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots.* New Phytologist, 84, 489-500.

Marsh B.A.B. (1971), *Measurement of length in random arrangements of lines*. Journal of Applied Ecology, 8, 265.

Newman E.Y. (1966), *A method of estimating the total length of root in a sample*. Journal of Applied Ecology, 3, 139.

Phillips J.M., Hayman D.S. (1970), *Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection* Transactions of the British Mycological Society, 55, 158.

Porter W.M. (1979), *The "most probable number" method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil*. Australian Journal of Soil Research, 17, 515-519.

02A09118

GIANFRANCO TATOZZI, *direttore* FRANCESCO NOCITA, *redattore*

(5651459/1) Roma, 2002 - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - S.

€ 4,80